Expression, Aufreinigung und Kristallisation des Kernimportrezeptors Importin 7

Diplomarbeit

vorgelegt von

Daniel Wohlwend

aus

München

angefertigt

im Institut für Mikrobiologie und Genetik an der biologischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

2004

Referent: Prof. Dr. Ralf Ficner

Korreferent: Prof. Dr. Ivo Feußner

Tag der Abgabe der Diplomarbeit: 30. März 2004

Letzter Tag der mündlichen Diplomprüfung: 10. Juli 2003

Danksagungen

Achim Dickmanns	für zahlreiche Hilfestellungen, Denkanstösse und Diskussionen
Ralf Ficner	für eine gute Betreuung und für sein großes Verständnis, wenn Probleme auftraten
Anja Strasser	für ihre Unterstützung bei der Laborarbeit und der Arbeit am Rechner
Winfried Lendeckel	für seine Hilfe bei vielen anderen technischen Fragen
Marie Henseleit	für alles!

1. Einleitung

1.1 Der Zellkern (Nucleus)

Eine eukaryotische Zelle zeigt im Vergleich mit Prokaryoten als evolutive Weiterentwicklung eine weitreichende Kompartimentierung. Diese erzeugt weitgehend voneinander separierte Reaktionsräume, welche das effiziente Nutzen der zellulären Ressourcen ermöglichen, indem sie Stoffwechselvorgänge räumlich voneinander trennen. Daher können Eukaryoten einen wesentlich differenzierteren Stoffwechsel aufbauen und zugleich ungewollte Substratzyklen (auch: *futile cycles*) verhindern.

Der Zellkern (Nucleus) der Eukaryoten ist eines der wichtigsten Unterscheidungsmerkmale zwischen Pro- und Eukaryoten. Er enthält die genomische DNA, die in ihrer gepackten Form als Chromatin bezeichnet wird, die Nucleoli, welche den Ort des Aufbaus der ribosomalen Untereinheiten darstellen und viele weitere Proteine, die an der Umsetzung des Genoms in Proteine beteiligt sind, wie z. B. Transkriptionsfaktoren. Während in Prokaryoten die Schritte der Proteinbiosynthese, also die Transkription der DNA-Matrize in prä-mRNA und die Translation der modifizierten mRNA in die codierte Aminosäuresequenz, parallel im Cytoplasma ablaufen, sind Transkription und Translation bei Eukaryoten räumlich und zeitlich durch die Doppelmembran des Nucleus voneinander getrennt. Die RNA-Biogenese und auch die DNA-Replikation bei in eukaryotischen Zellen finden im Karyoplasma statt, die Translation geschieht im Cytosol. Daher haben Eukaryoten die Möglichkeit die prä-mRNA vor dem Beginn der Translation zu modifizieren. Eine der wichtigsten Modifikationen ist das Herausschneiden von Introns, Genabschnitten, die für die Funktion des späteren Proteins nicht erforderlich oder sogar hinderlich sind. Eukaryoten ist es möglich nicht mehr sinnvolle Nucleotidsequenzen aus der prä-mRNA ausschneiden. Daher können sie eine größere Vielfalt an Proteinen synthetisieren als Prokaryoten, ohne für jede evolutionäre Anpassung die komplette Sequenz eines Genes neu evolvieren zu müssen Durch selektiven Zugang von Transkriptionsfaktoren sind Eukaryoten zusätzlich in der Lage, die Genexpression scharf zu kontrollieren und damit wesentlich größere Mengen an Erbinformationen zu verwalten. Schließlich wird durch den Zellkern eine höhere Stabilität der genetischen Information gewährleistet.

1.2 Kerntransport

Das Vorhandensein einer Kernmembran birgt einige Probleme, da karyophile Proteine, wie z. B. Transkriptionsfaktoren, ribosomale Proteine, RNPs und Histone, diese Membran auf ihrem Weg in den Nucleus durchdringen müssen, um ihre Effektorfunktion ausüben zu können. Zusätzlich müssen die im Kern synthetisierten RNAs, wie z. B. mRNAs und tRNAs, diese Barriere auf dem Weg ins Cytoplasma ebenfalls überwinden. Daneben existieren weitere Proteine, RNA und Protein/RNA-Komplexe, die zwischen beiden Kompartimenten hin- und herwechseln. Darüberhinaus wird die Situation durch die offene Mitose höherer Eukaryoten kompliziert, da hier karyophile Moleküle nach dem Wiederaufbau der Kernmembran nach abgeschlossener Teilung wieder in den Kern reimportiert werden und im Nucleus befindliche cytoplasmatische Moleküle ins Cytosol exportiert werden müssen. Die Lipiddoppelmembran des Nucleus ist von zahlreichen Kernporen durchsetzt, die jedoch für größere hydrophile Moleküle nahezu undurchlässig sind. Daher sind Mechanismen notwendig, die den Stoffaustausch zwischen Nucleus und restlicher Zelle gewährleisten.
Eine hochspezifische Transportmaschinerie aus löslichen Transportrezeptoren und den Proteinen des Kernporenkomplexes (NPC, engl.: nuclear pore complex) vermittelt den gerichteten Transport von Substraten durch die Kernhülle der Eukaryoten.

1.2.1 Der Kernporenkomplex

Im Zentrum des Kerntransports steht die Kernpore. Sie ist einer der größten makromolekularen Komplexe der Zelle. Sie hat ein geschätztes Molekulargewicht von etwa 125 MDa (Reichelt et al., 1990) und besteht aus etwa 30 Proteinen, die jeweils in mehreren Kopien vorliegen (Cronshaw et al., 2002) und als Nucleoporine bezeichnet werden. Der Kernporenkomplex der Hefe ist etwas kleiner mit ebenfalls etwa 30 verschiedenen Nucleoporinen (kurz: Nups) und einem Molekulargewicht von etwa 66 MDa (Rout und Blobel, 1993; Rout et al., 2000). Allen NPCs aber ist eine achtfache Rotationssymmetrie gemein. Die Zahl der Kernporen pro Zelle variiert mit der Zellgröße und Synthese- und Proliferationsaktivität des Zelltyps. Eine proliferierende humane Zelle besitzt etwa 3000-5000 Poren, eine einzige, reife *Xenopus* Oozyte enthält hingegen sogar etwa $5x10^7$ Kernporen (Cordes *et al.,* 1995).
Der NPC durchspannt die Kernhülle (NE, engl.: nuclear envelope) und bildet einen wassergefüllten Kanal zwischen Karyo- und Cytoplasma. Der Komplex ist über die drei Proteine gp210, POM121 und POM152 in der Kernmembran verankert (Pante *et al.,* 1996, Söderqvist *et al.,* 1997).

Neben diesem 55 MDa großen, zylindrischen Kerngerüst besitzt die Kernpore karyo- und cytoplasmatische Ringe, denen Filamente auf cytoplasmatischer Seite und eine korbähnliche Struktur auf nukleärer Seite (engl. nuclear basket) aufsitzen.

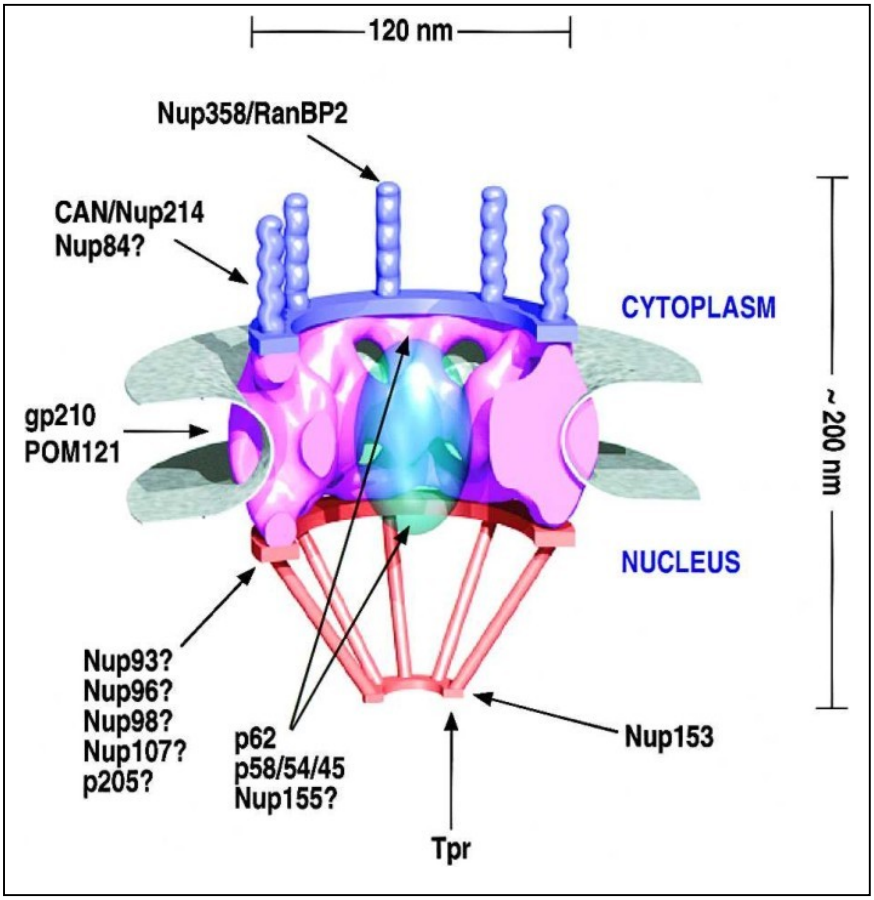


Abb. 1: Schematischer Querschnitt durch den Kernporenkomplex. Der Kernporenkomplex bildet eine 8-fache Rotationssymmetrie und ist mittels gp210, POM121 und POM152 in der Kernmembran verankert. Das Kernstück des zentralen Transporters bildet der p62-Komplex. Filamente reichen in das Cytoplasma, während eine korbähnliche Struktur ("nulear basket") in Richtung Karyoplasma zeigt.
(Abb. entnommen aus Allen et al., J. Cell Sci. 2000)

Die cytoplasmatischen Filamente werden durch die Nucleoporine CAN/Nup214, Nup 84, Nup88 und Nup358/RanBP2 gebildet, die mit den Proteinen RanGAP und RanBP1 assoziiert sind (Abb. 1, Mahajan et al., 1997). Für Export- und vor allem Importprozesse sind Interaktionen der Transportkomplexe mit dem am äußersten Teil des nuclear basket sitzenden Nucleoporin Nup153 essentiell (Shah *et al.,* 1998a und b, Nakielny *et al.,* 1999a und b, Ben-Efraim *et al.,* 2001, Bednenko et al. 2003a und b). Für Importprozesse vermittelt Nup153 die Termination der Translokation, für Exportprozesse die Initiation.
Eine Übersicht der Organisation des NPC ist in Abb. 2 dargestellt.

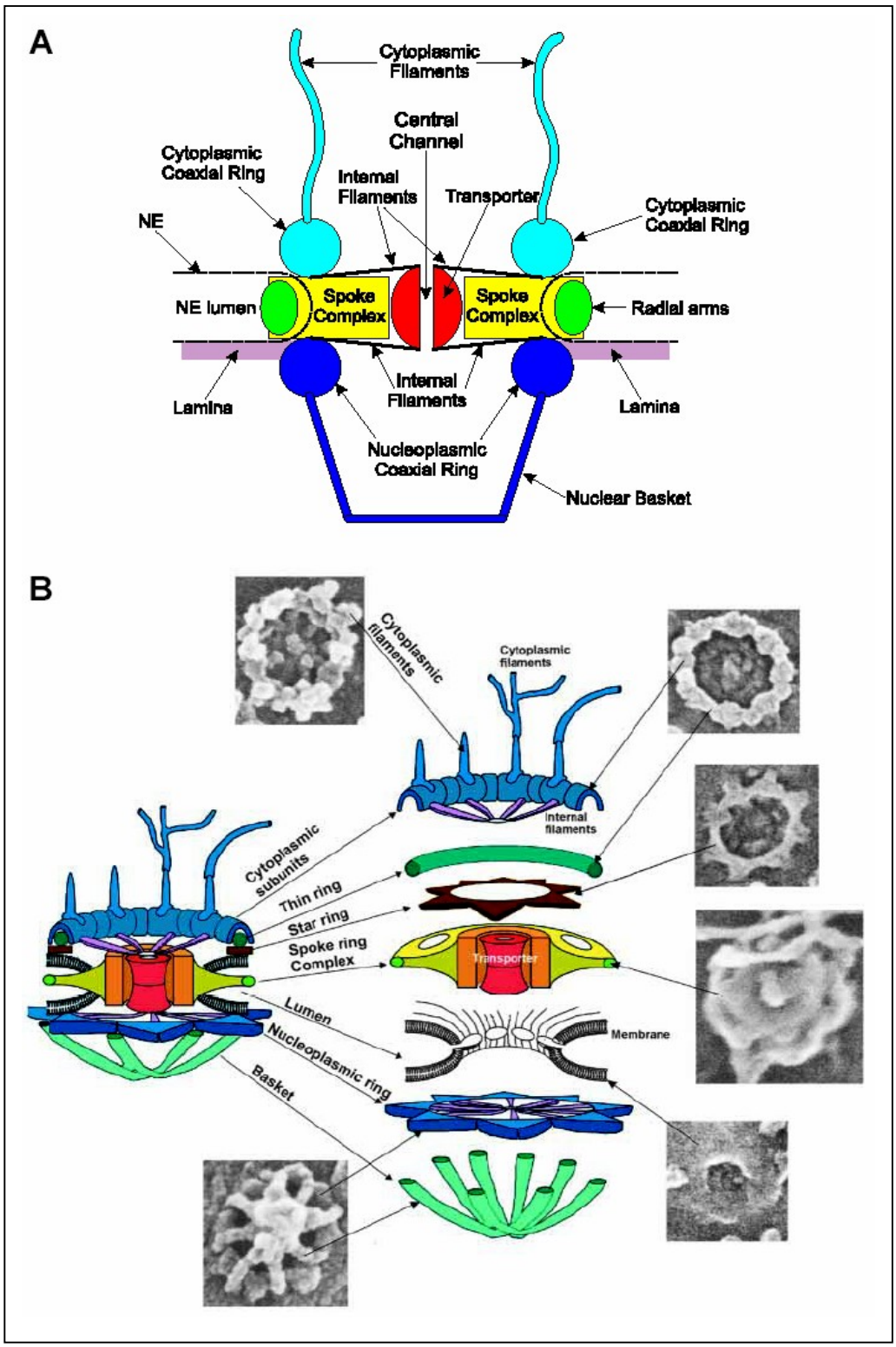


Abb. 2: (A) Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes. Die Darstellung des Querschnitts durch den NPC zeigt die einzelnen Komponenten im Verbund miteinander. **(B) Strukturelle Darstellung des NPC.** Links: Dreidimensionale Struktur des NPC. Rechts: Direkte Visualisierung der einzelnen Komponenten des Kernporenkomplexes durch FEISEM. Die Komponenten sind einzeln dargestellt. Der mehrlagige Aufbau des NPC gibt vom Membraninnern nach außen hin in etwa den Neuaufbau des NPC nach einer Mitose wider (modifiziert nach Goldberg et al., 1999).
(Abb. entnommen aus Allen et al., J. Cell Sci. 2000)

1.2.2 Kerntransport durch den NPC

Der NPC ermöglicht zwei Wege des Durchtritts von Molekülen in den Nucleus oder in das Cytoplasma: passive Diffusion und erleichterten Transport. Passive Diffusion durch die Pore ist mit ausreichender Geschwindigkeit aufgrund des Durchmessers des Diffusionskanals lediglich Molekülen mit einer Masse von 20-30 kDa vorbehalten (Paine et al., 1975, Görlich, mündl. Mitteilung, 2004). Jedoch gibt es viele Beispiele von kleineren Molekülen, die dennoch aktiv transportiert werden, wie z. B. Ran und Histone (Breeuwer und Goldfarb, 1990; Jäkel et al., 1999), auf beide wird noch eingegangen.

Der Mechanismus der Translokation durch den Zentralkanal des NPC wird mit dem sog. selektiven Phasenmodell beschrieben (Ribbeck und Görlich, 2001): Ein großer Teil der kanalbildenden Proteine besitzt seriell angeordnete Domänen, die aus einer Anzahl kurzer Peptide gebildet werden. Diese besitzen periodisch auftretende Wiederholungen der Motive FXFG oder GLFG (engl. FG-repeats) (Doye und Hurt, 1997; Rout et al., 2000). Diese Nucleoporine fungieren als Interaktionspartner für Transportkomplexe sowohl in Export- als auch in Importprozessen. Ein Gradient ansteigender Affinität der Rezeptor-Substrat-Komplexe zu diesen FG-repeats könnte die Translokation durch die Pore vermitteln (Ben-Efraim und Gerace, 2001). Dabei würden die koordinativen Bindungen, die die aromatischen Seitenketten der FG-repeats untereinander bilden, nacheinander gelöst und durch koordinative Bindungen der Phenylalanine mit Aromaten oder elektronenreichen Strukturelementen des Rezeptors ersetzt (Ribbeck und Görlich, 2001). Eine Anhäufung der gleichzeitigen Bindungen oder sterisch günstigere Koordinationen der delokalisierten π-Elektronensysteme der Phenylalaninseitenketten der Nucleoporine und der elektronenreichen Seitenketten des Transportkomplexes könnten so den Affinitätsanstieg erklären (Bayliss et al., 2002). Die räumliche Anordnung der Nucleoporine und ihrer FG-repeats ist charakteristisch und spielt daher bei der Direktionalität der Transportprozesse vermutlich eine wichtige Rolle (Ben-Efraim und Gerace, 2001).

Im Zentrum des Kanals befindet sich ein Komplex (Abb. 1) aus zwei Ringen, der ebenfalls eine Interaktion mit Transport-Substrat-Komplexen eingeht, und der als p62-Komplex bezeichnet wird.

1.2.3 Transportsubstrate und ihre Rezeptoren

Eine Vielzahl an Substraten muß die Kernhülle durchdringen, um an ihren Bestimmungsort im Cytosol beziehungsweise Karyoplasma zu erreichen. Dafür steht eine große Zahl an Transportrezeptoren zur Verfügung.

In Abb. 3 wird ein Stammbaum einiger bekannter Mitglieder einer Proteinfamilie, der Importin-β-Superfamilie, dargestellt, da sie den Großteil der bislang bekannten Transportrezeptoren darstellen (Mattaj und Engelmeyer, 1998; Görlich und Kutay, 1999; Nakielny und Dreyfuss, 1999a).

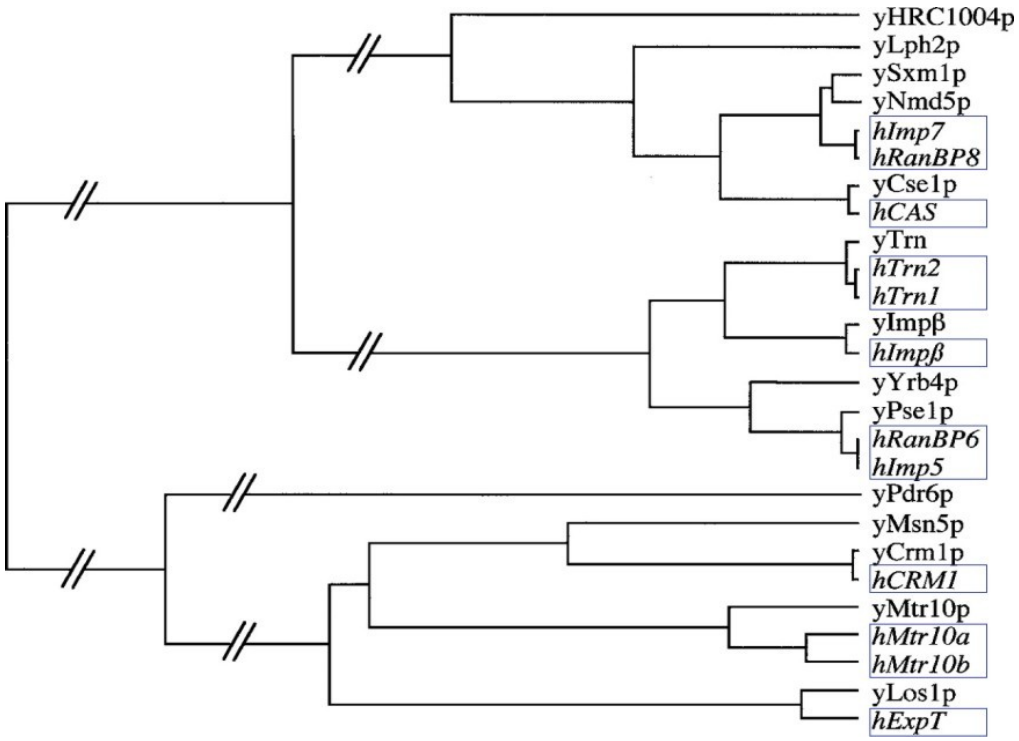


Abb. 3: Stammbaum der Importin-β-Superfamilie. Mitglieder der Importin-β-Superfamilie besitzen unterschiedlich große Sequenzähnlichkeiten zueinander. Die Abbildung zeigt schematisch den Verwandtschaftsgrad humaner (in blauen Kästchen) Rezeptoren und der homologen Faktoren in Hefe (S. cerevisiae).
(Abb. entnommen aus Görlich und Kutay, Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 1999)

Für weitere Informationen zur Impβ-Superfamilie vgl. Abschnitt 1.3.1.

Für die Erkennung der Transportsubstrate durch ihre spezifischen Rezeptoren existieren Lokalisationssignale in der Aminosäuresequenz der Substrate, die ihnen eine Cytoplasma- oder Kernlokalisation zuweisen.

Das häufigste Kernexportsignal in Proteinen ist das sog. NES (engl. nuclear export signal), eine kurze, Leucin-reiche Sequenz (Fornerod et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Ossareh-Nazari et al., 1997; Stade et al., 1997). Ein bedeutender Transportrezeptor für Exportprozesse ist Crm1 (Fornerod et al., 1997; Ossareh-Nazari et al., 1997; Stade et al., 1997; Nakielny und Dreyfuss, 1997).

Eine kurze Darstellung von Exportzyklen wird in Abb. 5 gezeigt.

Als Kernimportsignale werden von den Importrezeptoren bestimmte Sequenzabschnitte auf der Oberfläche der Transportsubstrate erkannt (Adam und Gerace, 1991), die als NLS (engl. nuclear localisation sequence) bezeichnet werden.

Es existieren mehrere verschiedene Typen von NLSs, die im Folgenden vorgestellt werden:

Klassische NLSs:

- T-NLS (von *SV40 large T antigen-type*) (Kalderon et al., 1984; Lanford und Butel, 1984; Lanford et al., 1986). Dies ist eine kurze Sequenz aus 7 bis 8 Aminosäuren mit normalerweise 4 Lysinen, z. B. PKKKRKV. Dieses Importsignal ist eine Spezialform des von Nucleoplasmin bekannten Signals.
- bpNLS (von engl. *bipartite NLS*) (Robbins et al., 1986). Dies sind zwei kurze basische Sequenzen, die durch eine sog. „spacer region" getrennt sind. Das bpNLS ist von Nucleoplasmin bekannt.

Die klassischen NLSs werden durch Mitglieder der Importin-β-Superfamilie (Chi et al., 1995; Mattaj und Englmeier, 1998; Görlich und Kutay, 1999; Nakielny und Dreyfuss, 1999) erkannt und entweder mit dem Rezeptor oder über den Ein-Rezeptor-Ein-Adapter- Weg in den Kern transportiert. Als Beispiel sei das Impα/Impβ-Heterodimer genannt, da es den funktionellen Rezeptor für Substrate mit T-NLS darstellt. (Görlich et al., 1995a). Impβ stellt hier den funktionellen Importrezeptor dar (Moroianu et al., 1995; Görlich et al., 1995b, 1996a), Imp α (Moore und Blobel, 1994) den Adapter für das Substrat.

Weitere NLSs:

Sie bestehen häufig ebenfalls aus basischen Sequenzabschnitten auf der Oberfläche der Transportsubstrate, diese sind aber komplexer aufgebaut, diffuser verteilt und daher häufig nicht aus Sekundärstrukturvorhersagen abzuleiten.

Importsubstrate mit solchen NLSs sind z. B. ribosomale Proteine und Histone. Der Import einiger dieser Proteine wird durch Importin 7 (auch: RanBP7) (Görlich et al., 1997a) vermittelt. Es übernimmt hier Rezeptorfunktionen beim Ein-Rezeptor-Weg (vgl. 1.2.4), kann aber auch als Corezeptor fungieren, besonders im Verbund mit Impβ (vgl. 1.2.4).

Schließlich gibt es weitere Substrate, die sowohl ein NES als auch ein NLS besitzen (Guiochon-Mantel et al., 1994). Die beiden Sequenzen lassen sich nicht immer voneinander trennen. Die M9-Sequenz ist ein Beispiel für ein solches bidirektionelles Lokalisationssignal (Pollard et al., 1996). Sie ist eine Domäne aus etwa 40 in der Primärstruktur nicht notwendigerweise benachbarter Aminosäuren, die reich an Glycin und aromatischen Seitenketten ist (Pollard et al., 1996, Bogerd et al., 1999). Bidirektionelle Lokalisationssignale finden sich häufig in Proteinen, die mRNA-bindend sind.

Die Tabellen 1 und 2 zeigen eine Auswahl einiger Import- und Exportsubstrate und ihrer zugehörigen Rezeptoren.

Tab.1: Importsignale und -rezeptoren

Importsubstrat	Substratfunktion	Importsignal	Importrezeptor
Proteine mit klassischer NLS	Breites Spektrum von Funktionen im Kern	T NLS: PKKKRKV bpNLS: KRPAAIKKAGQAKK K, i. A. Lysin-reich	Impα/Impβ Komplex
U snRNP	Spleißen	m_3G-cap Sm-Domäne	Snurportin1/Impβ Komplex n. b.
Replikationsprotein A (70 kDa Untereinheit)	Replikation	nicht bekannt	RIPα/Impβ Komplex
Linker-Histon H1	Chromatinstruktur und -funktion	zwei breite Domänen basischer Aminosäuren	Impβ/Imp7 Komplex
Core-Histone	Chromatinstruktur und -funktion	ausgedehnte Domäne basischer Aminosäuren	Impβ, Imp5, Imp7, Transportin1
HIV-1 Rev HTLV-1 Rex HIV-1 Tat	virale RNA-Exportfaktoren viraler Transkriptionsfaktor	RQARRNRRRRWR argininreiche Sequenzen	Impβ
Integrase des RTC von HIV-1	Integration viraler DNA in Wirtsgenom	ausgedehnte Domäne basischer Aminosäuren	Imp7
ribosomale Proteine	Translation	argininreiche Domänen	Impβ, Imp5, Imp7, Transportin1
Cyclin B1	Zellzyklus	Aminosäuren 121-373 Aminosäuren 1-61	Impβ kein Faktor nötig in vitro
5S rRNA	Translation	ribosomales Protein L5	mögl. Impβ
SR Protein	Spleißen	SR-Domäne	Transportin-SR
β-Katenin	Transkription	nicht genau identifiziert, arm-repeats	kein Faktor nötig in vitro

Tab. 2: Exportsignale und –rezeptoren

Exportsubstrat	Substratfunktion	Exportsignal	Exportrezeptor
Proteine mit NES	breites Spektrum	LALKLAGLDI, leucinreich	CRM1/Exportin1
U snRNA	Spleißen	CBC Proteine mit NES	CRM1/Exportin1
5S rRNA	Translation	mögl. mit TFIIIA oder L5	CRM1/Exportin1
Snurportin1	Adapterprotein für U snRNP-Import	~150 Aminosäuren große Region	CRM1/Exportin1
tRNA	Translation	Akzeptorarm und TΨC-Arm	Exportin1
Imp α	Adapter für Importin β-Rezeptor	~140 Aminosäuren große Region	CAS
mRNA	Genexpression	hnRNP Proteine TAP	nicht bekannt
SR-Proteine	Spleißen	SR-Domäne	nicht bekannt

1.2.4 Kerntransportzyklen im Vergleich

Die große Vielzahl und die chemische Unterschiedlichkeit der Transportsubstrate bedingt eine große Diversität an Transportrezeptoren und mehrere Transportstrategien.

Die außerordentlich hohe Spezifität der Transportrezeptoren für ihre Substrate wird nämlich nicht ausschließlich dadurch erreicht, daß jeder bekannte Rezeptor ein bestimmtes Substrat durch die Kernpore translozieren kann. Es gibt darüberhinaus zwei andere bislang identifizierte Transportsysteme, so daß insgesamt bis heute drei Systeme bekannt sind:

1. Der Ein-Rezeptor-Weg: Ein Import- oder Exportrezeptor bindet sein Substrat und transloziert es durch die Pore. Nach der Translokation wird das Substrat durch die Bindung eines weiteren Rezeptors an den Importrezeptor freigesetzt. Ein Beispiel hierfür ist der Import von rpL23a durch Imp7 (Rout et al., 1997; Jäkel und Görlich, 1998).
2. Der Ein-Rezeptor-Ein-Adapter-Weg: Ein Transportrezeptor bindet das Substrat und fungiert anschließend als Adapter für einen zweiten Transportrezeptor, der den eigentlichen Transport durch den NPC vermittelt. Nun löst sich der Transportrezeptor durch Bindung eines zweiten Rezeptors und gibt den Adapter-Substrat-Komplex frei. Dieser dissoziiert schließlich. Als Beispiel sei der Import eines klassische-NLS-tragenden Substrats durch das Impα/Impβ-Heterodimer (Adam et al., 1994; Görlich et al., 1994; Moroianu et al., 1995; Imamoto et al., 1995) genannt.
3. Der Zwei-Rezeptoren-Ein-Substrat-Weg: Vor der Translokation dimerisieren zwei Rezeptoren und bilden erst jetzt ein funktionelles Transportrezeptorheterodimer. Nun erfolgt die Bindung an das Substrat und dann der Transport. Schließlich dissoziiert erst der eine, dann der andere Transportrezeptor vom Substrat. Ein Beispiel ist der Import des Linker-Histons H1 durch das Impβ/Imp7-Heterodimer (Jäkel et al., 1999; Baake et al., 2001; Bäuerle et al., 2002).

Allen drei Wegen ist ein einheitliches Muster gemein: Die Bindung des funktionellen Rezeptors an das Substrat erfolgt auf der einen Seite der Kernmembran, gefolgt von der Translokation durch den Zentralkanal des NPC unter Ausbildung verschiedener koordinativer Bindungen an die FG-repeats der Nucleoporine. Nach Erreichen der anderen Seite des NE dissoziieren Rezeptor und Substrat, und schließlich kehrt der Rezeptor in sein originäres Kompartiment zurück.

Eine zentrale Rolle bei Kerntransportprozessen spielt der Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungszyklus der kleinen ras-verwandten GTPase Ran. (Nigg et al., 1991; Davis, 1992; Melchior et al., 1993; Moore und Blobel, 1993; Guiochon-Mantel et al., 1994). Er ist in Abb. 4 dargestellt. Die GTPase-Domäne von Ran kann GTP zu GDP und P_i hydrolysieren. Sie kommt deshalb in zwei Formen vor: Die eine ist GTP-gebunden und liegt überwiegend im Karyoplasma vor, die andere ist GDP-gebunden und ist nahezu vollständig cytoplasmatisch.

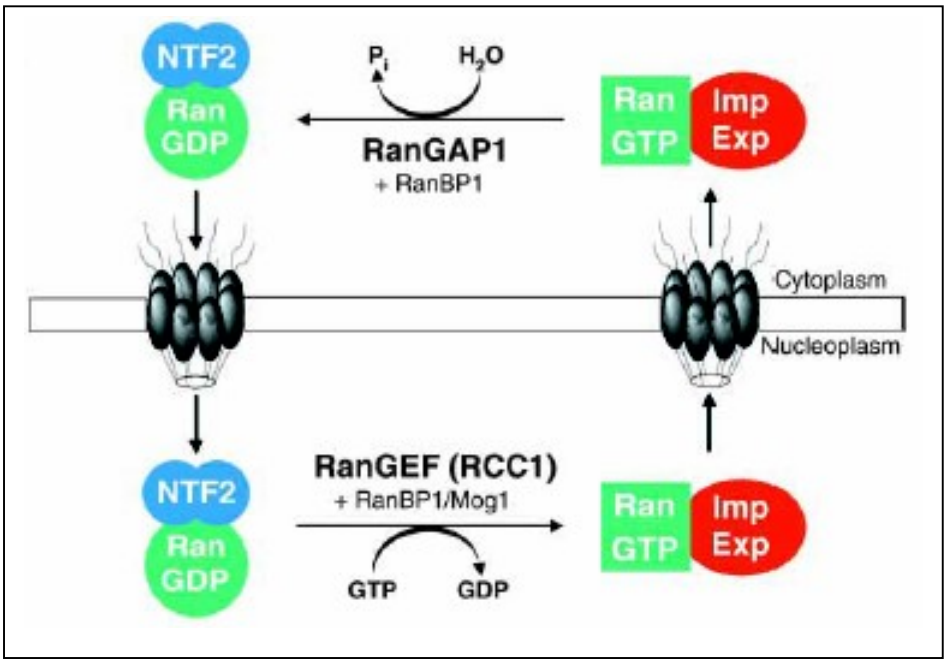


Abb. 4: Der RanGTPase-Zyklus. Die GTP-Hydrolyse erfolgt im Cytoplasma. Die Aktivierung der GTPase geschieht durch die Bindung von RanGAP1 und RanBP1. Der Import von RanGDP in den Kern wird durch NTF2 vermittelt. Dort erfolgt der Nucleotidaustausch durch RCC1. Am Austausch sind möglicherweise auch RanBP1 und Mog1 beteiligt. Der Export von RanGTP durch die Bindung an ein RanGDP-bindendes Karyopherin (Imp/Exp) beschließt den Zyklus.

Über den NE besteht ein ausgeprägter Gradient mit einer hohen Konzentration an RanGTP im Kern und einer niedrigen im Cytoplasma. Der RanGDP-Gradient ist entgegengerichtet (Görlich et al., 1996b; Izaurralde et al., 1997) und wird durch das Zusammenspiel mehrerer Enzyme erzeugt. Im Kern wird stetig RanGTP aus RanGDP erzeugt, indem durch RCC1 (engl. regulator of chromosome condensation 1) der nötige Nucleotidaustausch katalysiert wird (Bischoff und Postingl, 1991, 1995; Klebe et al., 1995, Geyer et al., 1999). RCC1 gehört zu den RanGEFs (engl. Ran-guanine-nucleotide-exchange-factor). Möglicherweise sind am Nucleotidaustausch weitere Faktoren beteiligt, nämlich nucleäres RanBP1 und Mog1 (engl. multicopy suppressor of GSP1, Oki und Nishimoto, 1998; Stewart und Baker, 2000). Mog1 wurde ursprünglich in Hefe entdeckt, ein Ortholog gleicher Funktion ist zwischenzeitlich aber auch in *Xenopus* gefunden worden (Nicolás et al., 2001). Im Cytoplasma wird RanGTP abgebaut und damit RanGDP erzeugt. Dies geschieht durch die gemeinsame Aktivität von RanBP1 und RanGAP1 (Bischoff et al., 1994,1995; Bischoff und Görlich, 1997), welches teilweise an RanBP2, einem Protein der cytoplasmatischen Filamente des NPC, situiert ist, zu großen Teilen aber auch frei im Cytoplasma vorkommt (Mahajan et al., 1997, 1998) und die geringe intrinsische Hydrolyseaktivität der GTPase erheblich steigert (Bischoff et al., 1994). RanBP1 (engl. Ran-binding-protein 1) und RanGAP1 (Ran-GTPase-activating-protein 1) binden vermutlich kooperativ an RanGTP und erhöhen gemeinsam die Hydrolyserate von RanGTP um den Faktor 10^6 (Bischoff et al., 1995) Dadurch wird im Cytosol ständig RanGTP angebaut, während es im Nucleus synthetisiert wird.

Der Transport von RanGDP in den Nucleus, damit dort der Nucleotidaustausch stattfinden kann, wird durch den Rezeptor NTF2 (engl. nuclear transport factor 2) vermittelt (Moore und Blobel, 1994; Paschal und Gerace, 1995; Ribbeck et al., 1998; Chaillan-Huntington et al., 2000).

Diese Asymmetrie der RanGTP-/RanGDP-Verteilung bewirkt die Bidirektionalität der Transportprozesse durch den NPC (Izaurralde et al., 1997). Dies soll am Beispiel von Importin-β-vermittelten Transportprozessen erläutert werden (s. auch Abb. 5):

Das Freisetzen des Importsubstrats, das auch an einen Adapter wie Impα gebunden vorliegen kann, von Nup153 nach der Translokation durch den NPC wird durch die Bindung von Impβ an RanGTP ausgelöst (Chi et al., 1996; Görlich et al., 1996b; Izaurralde et al., 1997). Die Bindungsdomäne von Impβ für RanGTP überlappt jene für das Importsubstrat (Cingolani et al., 1999; Vetter et al., 1999;). Daher verursacht die Bindung an RanGTP eine Konformationsänderung von Impβ (Nevo et al., 2003), so daß dessen Affinität zu seinem Substrat drastisch sinkt. Das Substrat wird freigesetzt, der Impβ/RanGTP-Komplex löst sich vermutlich von Nup153 (Vetter et al., 1999, Bayliss et al., 2000a und b). Anschließend kehrt der Impβ/RanGTP-Komplex durch die Kernpore in das Cytosol zurück (Izaurralde et al., 1997). Damit Impβ für einen neuen Import zur Verfügung stehen kann, muß der Impβ/RanGTP-Komplex aufgelöst werden. Sobald die von RanBP1 und RanGAP1 beschleunigte Hydrolyse von GTP zu GDP stattgefunden hat, sinkt die Affinität von Ran zu Impβ so stark ab, daß der Komplex dissoziiert (Cingolani et al., 1999; Vetter et al., 1999). RanGDP wird nun über NTF2 in den Kern reimportiert. Dort kommt es durch die Aktivität von RCC1 zum Nukleotidaustausch, so daß schließlich RanGTP rekonstituiert ist. Die Energie der Hydrolysereaktion wird also nicht direkt im eigentlichen Transportprozeß verbraucht. Bei Exportprozessen erhöht die Bindung von RanGTP an den Exportrezeptor im Nucleus dessen Affinität zum Substrat, also exakt umgekehrt wie bei Importrezeptoren, so daß die RanGTP-Bindung in diesem Fall vor der Translokation durch den NPC stattfinden muß (Abb. 6).

Eine hohe Konzentration von RanGTP im Nucleus hat also das Freisetzen eines karyophilen Substrates vom Importrezeptor beziehungsweise das Binden eines cytosolischen Substrates an einen Exportrezeptor zur Folge. Darüberhinaus gewährleistet sie den Export des substratungebundenen Importrezeptors. Damit es nicht zu einem Transport eines Importrezeptors ohne Substrat in den Nucleus oder zum Erliegen von Exportprozessen kommen kann, muß die RanGTP-Konzentration im Cytosol niedrig und damit die RanGDP-Konzentration hoch sein. Auf diese Weise ist die Bidirektionalität von Transportmechanismen gewährleistet.

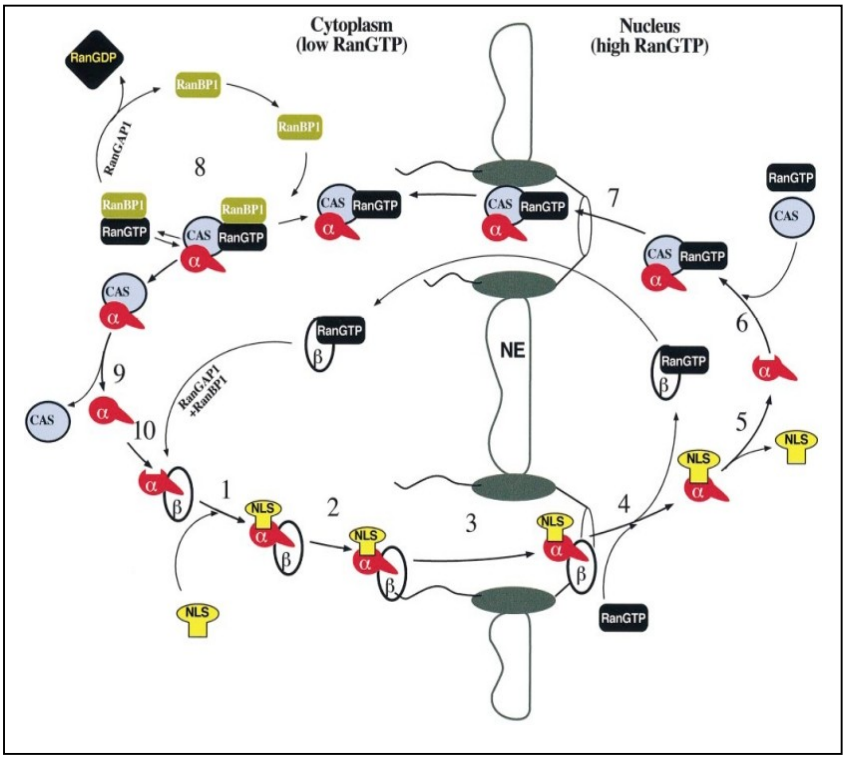


Abb. 5: Impα/Impβ-vermittelter Transport eines Substrates mit klassischem NLS. Die Formierung des Impα/Impβ-Heterodimers (10) ist die Voraussetzung für die Bindung des Transportsubstrats (1). Impα stellt dabei die Bindungs-domäne für das Substrat bereit. Nach der Translokation durch die Kernpore (2, 3) setzt die Bindung von RanGTP an Impβ den Impα-Substrat-Komplex ins Karyoplasma frei (4). Dort dis-soziiert das Substrat von Impα (5). Die Importrezeptoren wer-den in das Cytosol exportiert (6, 7) und durch die Hydrolyse des GTP freigesetzt (8 und 9).

(Abb. entnommen aus Görlich, EMBO J. 1998)

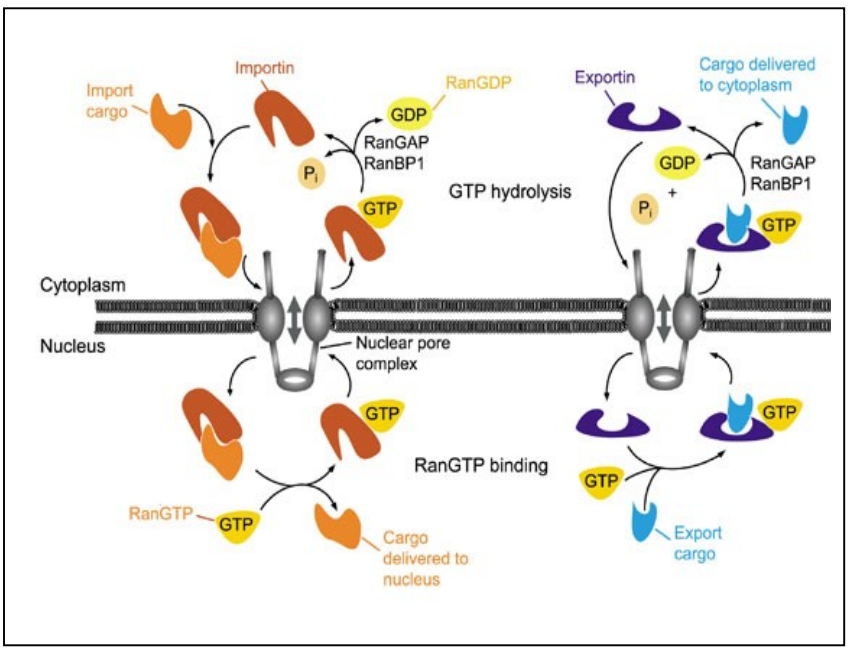


Abb. 6: Schema von Import- und Exportzyklen durch den NPC. Der Vergleich von Im- und Export zeigt, daß die Bindung von RanGTP an den Importrezeptor nach der Translokation durch den NPC geschieht, während bei Exportprozessen die Bindung vor der Translokation erfolgen muß. Beides geschieht aber im Nucleus. Es wird die entgegen-gesetzte Affinitätsänderung von Im- und Exportrezeptoren zum Substrat nach RanGTP-Bindung deutlich.

(Abb. entnommen aus Ström und Weis, Genome Biol. 2001)

Die Freisetzung des Substrats erfolgt hier durch die durch RanBP1 und RanGAP1 vermittelte Hydrolyse des GTP. Auf diese Weise wird der gerichtete Transport durch die Kernpore gesichert. Die Rückgewinnung von nucleärem RanGTP erfolgt auf die gleiche Weise wie bei Importprozessen.

1.3 Der Kernimportrezeptor Importin 7

1.3.1 Strukturelle Daten zu Importin 7

Importin 7 aus *Xenopus laevis* (accession number: RanBP7, U71082) ist ein Transport-rezeptor von 1038 Aminosäuren Länge und einem Molekulargewicht von 119,4 kDa. Der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei pH 4,6. Er gehört zur Familie der Importin-β-ähnlichen Transportrezeptoren (Görlich et al., 1997a und b).

Die systematische Einordnung nach PSIpredict ist wie folgt:

Stamm:	Scop	
	Klasse:	All-alpha-Proteine
	Faltung:	alpha-alpha-Superhelix
	Superfamilie:	ARM-repeat-Proteine
	Familie:	HEAT-repeat-Proteine

Wie alle Mitglieder der Impβ-Familie besitzt Imp7 neben dem niedrigen pI eine N-terminale Ran-Bindungsstelle, die aus mehreren HEAT(Huntingtin-elongation-A-subunit-TOR)-repeats besteht, eine oder mehrere Nup-Bindungsstellen, deren Positionen unbekannt sind, und offenkundig mehr als eine Substratbindungsstelle (Jäkel und Görlich, 1998; Görlich und Kutay, 1999; Baake et al., 2001; Bäuerle et al., 2002). In Abb. 7 ist die Struktur von Impβ dargestellt, um die einzelnen Merkmale von Proteinen der Impβ-Familie und Substratbindungsstellen zu illustrieren. Die kristallographischen Daten stammen von Cingolani et al., 1999, Vetter et al., 1999 und Bayliss et al., 2000. Die Impβ-Fragmente wurden jeweils mit His-Tag kristallisiert.

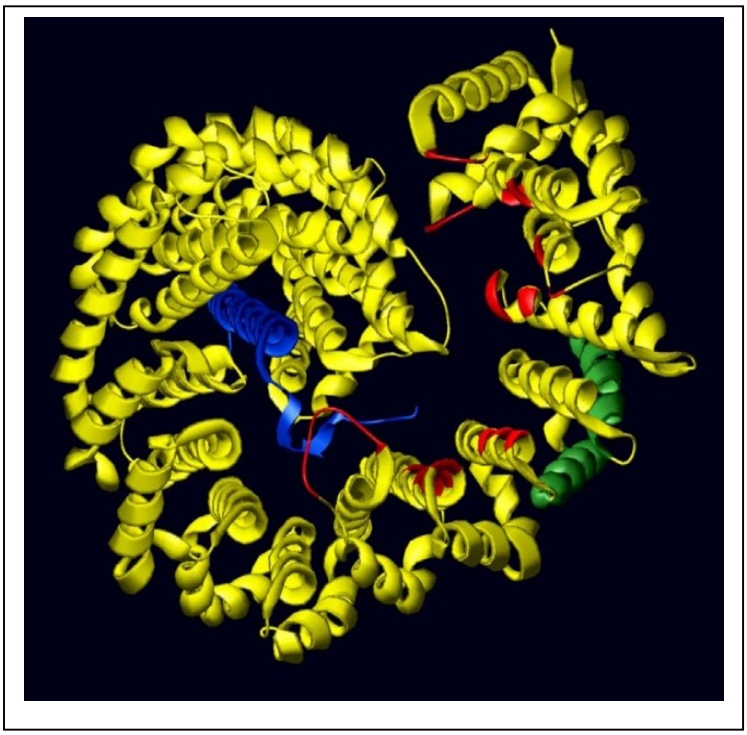


Abb. 7: Struktur von Impβ. Impβ ist aus 19 HEAT-repeats aufgebaut. Jedes besteht aus einer A- und einer B-Helix, die durch einen kurzen Loop verbunden sind. Der Loop in HEAT 8 ist saurer Natur und reguliert die Substratbindung und –freisetzung. Die grünen Helices interagieren mit FxFG-repeats von Nucleoporinen. In blau ist die Bindungsstelle für die IBB-Domäne von Imp α dargestellt, in rot jene für RanGTP. Der rote Loop in der Nähe der IBB-Bindungsdomäne kontaktiert sowohl die Ran- als auch die IBB-Bindungsdomäne und ist für die reziproken Affinitäten von Impβ zu RanGTP beziehungsweise Impα verantwortlich.

(Abb. entnommen aus Ström und Weis, Genome Biol. 2001)

Darüber hinaus ist Imp7 offensichtlich äußerst vielseitig und wie andere Mitglieder der Impβ-Familie in sich sehr beweglich (Fukuhara et al., 2004). Die Helix-Zusammensetzung ist bei Imp7 vermutlich nicht so regelmäßig wie bei Impβ.

Die Bindungsdomäne für Imp β liegt C-terminal und besteht wahrscheinlich aus den letzten 31 Aminosäuren (aa 1008-1038) (Bäuerle et al., 2002). Abb. 8 stellt die Kartierung der Bindungsdomänen von Impβ und Imp7 zueinander dar.

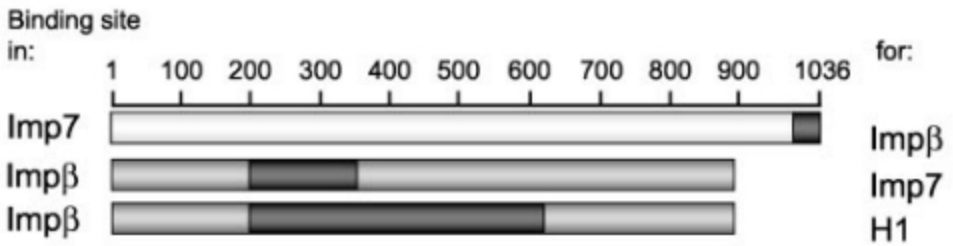


Abb. 8: Kartierung der Bindungsstellen in Imp7 und Impβ zueinander. Aminosäuresequenzen, die für eine Bindung essentiell sind, sind dunkelgrau dargestellt, nicht essentielle in mittelgrau (Impβ) und hellgrau (Imp7). Die Bindungsstelle in Imp7 für Impβ ist am C-Terminus lokalisiert und umfaßt die letzten 31 Aminosäurereste. Die Bindungsstelle in Impβ für Imp7 umfaßt etwa 160 aa zwischen aa 200 und aa 360. Es ist bemerkenswert, daß die Bindungsstellen für Imp7 und das Linker-Histon H1 überlappen. Anmerkung: Vollängen-Imp7 aus *Xenopus* ist nicht, wie dargestellt, 1036, sondern 1038 aa lang.

(Abb. entnommen aus Bäuerle et al., J. Biol. Chem. 2002)

Imp7 ist nicht nur auf Vertebraten beschränkt, ein Ortholog wurde auch in *Drosophila melanogaster* entdeckt, welches als DIM-7 bezeichnet wird (Lorenzen et al., 2001; Baker et al., 2002) und ebenfalls als Kernimportrezeptor fungiert.

1.3.2 Importsubstrate von Importin 7

Es wurden bislang mehrere Substrate identifiziert, die durch Imp7 in den Nucleus transportiert werden. Zu ihnen gehören die ribosomalen Proteine S7, L5 und L23a (Jäkel und Görlich, 1998), die Integrase aus dem Reverse Transkriptions-Komplex von HIV-1 (Fassati und Goff, 2001; Fassati et al., 2003), core-Histone (Baake et al., 2001; Mühlhäusser et al., 2001) und weitere DNA-/RNA-bindende Proteine (Goff, 2001).

Der Import von ribosomalen Proteinen in den Nucleus ist erforderlich, da die ribosomalen Untereinheiten in den Nucleoli synthetisiert werden (Melese und Xue, 1995). Dazu werden die ribosomalen Proteine mit rRNAs kombiniert und die fertigen ribosomalen Untereinheiten anschließend aus dem Nucleus in das Cytoplasma exportiert.

HIV gilt seit seiner Entdeckung (Gottlieb et al., 1981) als gefährlichstes aller Retroviren. Daher gilt der Aufklärung der Interaktionen von viralen Proteinen mit der Wirtszelle große Aufmerksamkeit. Hier ist insbesondere der Import von HIV-Proteinen in Hinblick auf die Eigenschaft von HIV interessant, für die Infektion der Wirtszelle nicht auf deren Teilung angewiesen zu sein. Die meisten Retroviren benötigen diese offene Mitose, um Zugang zum Nucleus zu erhalten. HIV hingegen nutzt die zelleigene Transportmaschinerie, um das virale Genom in den Nucleus der Wirtszelle zu importieren (Goff, 2001). Einer der wichtigsten Transportrezeptoren in diesem Zusammenhang ist Imp7.

Allen bislang bekannten Substraten ist gemein, daß es sich um basische Proteine handelt. Viele von ihnen aggregieren und fallen aus, wenn sie ungebunden im Cyto- oder Karyoplasma vorliegen. Daher wird beim Import solcher Substrate eine chaperonartige Rolle von Imp7 vermutet (Jäkel et al., 2002), welches die ausgedehnten, basischen Bereiche auf der Oberfläche des Importsubstrats verdecken und so ungewollte Interaktionen verhindern könnte.

1.3.3 Importin 7-abhängige Importwege

Karyophile Substrate von Imp7 werden i. d. R. über den schon bekannten Ein-Rezeptor-Weg in den Kern transportiert (Abb.6).
Ihre Kernlokalisationssequenzen gehören nicht zu den klassischen NLSs, vielmehr scheinen große basische Bereiche auf der Oberfläche eine Art Konsensussequenz für den Imp7-vermittelten Kernimport zu sein.

1.3.4 Das Importin β/Importin 7-Heterodimer

Imp7 und Impβ liegen in der Zelle nicht nur alleine, sondern zum Teil auch als Heterodimer vor (Görlich et al., 1997a; Görlich, 1997b). Das Impβ/Imp7-Heterodimer ist ein funktioneller Importrezeptor für mehrere Substrate:

1. Es importiert den RTC (engl. reverse transcription complex) von HIV-1 in den Nucleus der Wirtszelle (Fassati et al., 2003). Die Integrase (IN) des RTC (Farnet und Haseltine, 1991) wird, wie bereits erwähnt, *in vitro* auch von Imp7 allein importiert.
2. Das Linker-Histon H1 ist ebenfalls ein Importsubstrat des Dimers (Jäkel et al., 1999, Bäuerle et al., 2002). Der Importweg von H1 ist in Abb. 8 detaillierter dargestellt.
3. Unter Beteiligung des Histons H1 wird auch DNA von Adenoviren durch das Impβ/Imp7-Heterodimer in den Nucleus importiert.

Das Heterodimer zeigt dabei eine bemerkenswerte Stabilität, da es sich gemeinsam aufreinigen läßt, ohne dabei zu dissoziieren (Görlich et al., 1997a). Die Bindung ist dabei hochspezifisch, da sie durch RanGTP gelöst werden kann. Die Bildung des Heterodimers kann zusätzlich durch die IBB-Domäne von Impα, welche an Impβ bindet, inhibiert werden (Görlich et al., 1997a), was die Spezifität der Bindung zusätzlich unterstreicht.

1.3.5 Der H1-Kernimportweg

H1-Histone enthalten zwei strukturell unterschiedliche Domänen, die als NLS erkannt werden. Die erste befindet sich im unstrukturierten C-terminalen Teil des Histons und ist reich an basischen Aminosäureresten. Sie wird durch mehrere Importrezeptoren erkannt, wie z. B. Transportin1, Imp5 (RanBP5) und Imp7 (Bäuerle et al., 2002).

Die zweite Domäne hingegen liegt zentral, enthält nur wenige basische Aminosäuren und wird ausschließlich durch Impβ erkannt. Jedoch ist kein Rezeptor allein in der Lage, H1 zu importieren. Hierfür wird das Impβ/Imp7-Heterodimer benötigt. Nach Bildung des Impβ/Imp7-Heterodimers im Cytoplasma kann dieses das Linker-Histon H1 binden und anschließend als ternärer Komplex den NPC durchqueren (Abb. 9).

Bei der Bindung des Komplexes an den NPC kommt Impβ eine entscheidende Rolle zu, während Imp7 zunächst eine passivere Rolle einzunehmen scheint. Nach der Translokation, deren Vorgang gegenwärtig noch nicht genauer untersucht ist, induziert die Bindung von RanGTP an Impβ das Freisetzen des binären Komplexes Imp7/H1 in das Karyoplasma (Jäkel et al., 1999). Imp7 übernimmt hierbei offensichtlich eine Chaperonfunktion, indem es nun die Oberfläche des Histons vor Interaktionen mit karyoplasmatischen Bestandteilen und dem Karyoplasma selbst durch Abschirmung schützt (Jäkel et al., 1999; Jäkel et al., 2002). Dieser Komplex wandert nun zum Chromatin, wo H1 seine Funktion aufnehmen kann. Die Freisetzung des Histons von Imp7 wird vermutlich durch eine Bindung von Imp7 an RanGTP ausgelöst, so daß nach dem Reexport beider beteiligter Transportrezeptoren zwei RanGTP-Moleküle regeneriert werden müssen (Jäkel et al., 1999; Bäuerle et al., 2002).

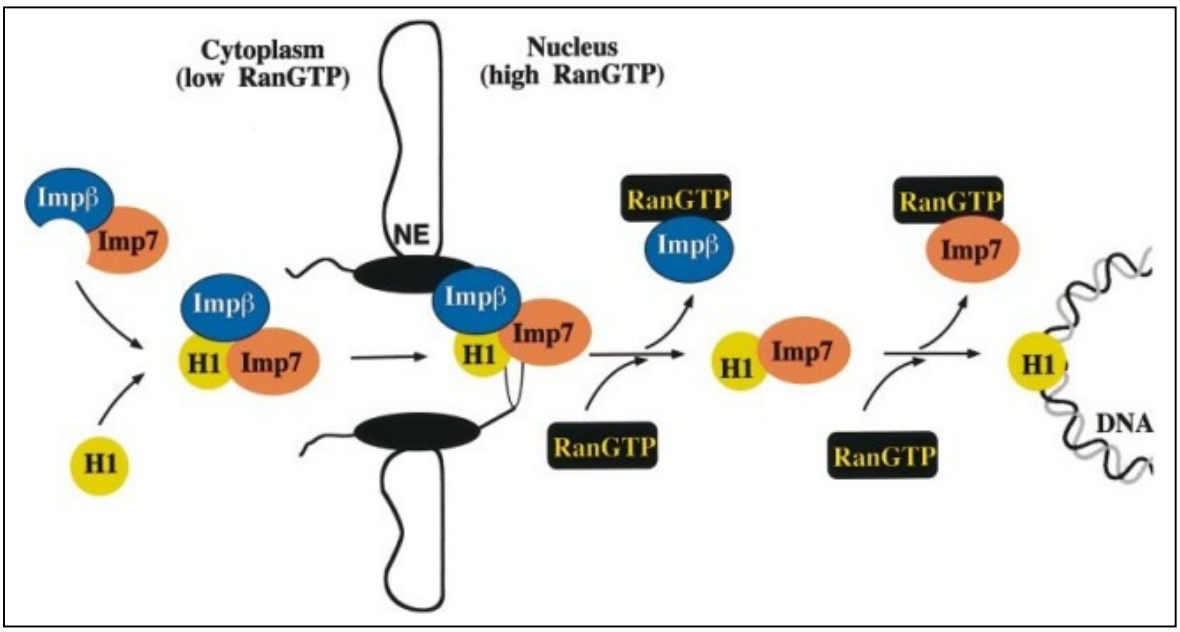


Abb. 9: Der H1-Importweg. Nach Bildung des Impβ/Imp7-Heterodimers bindet es das Histon H1. Nach der Translokation durch die Kernpore vermittelt die RanGTP-Bindung an Impβ die Dissoziation des ternären Komplexes. Impβ/RanGTP kehrt ins Cytoplasma zurück, Imp7 transferiert H1 zur DNA. Dort wird das Histon durch die Bindung eines RanGTP an Imp7 freigesetzt. Schließlich kehrt auch Imp7/RanGTP ins Cytoplasma zurück.

(Abb. entnommen aus Jäkel et al., EMBO J. 1999)

1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die Aufgabenstellung dieser Diplomarbeit bestand zum einen in der Entwicklung einer Expressions- und Aufreinigungsstrategie für den Kernimportrezeptor Importin 7. Dazu sollten Expression und Aufreinigung so weit optimiert werden, daß die für die Kristallographie nötigen Ausbeuten erreicht werden.

Weiterhin sollte die Funktionalität des aufgereinigten Produkts durch Aktivitätstests belegt und die Interaktion mit den Bindungspartnern Importin β und H1 genauer untersucht werden.

Der dritte Aufgabenteil bestand in der Kristallisation von Importin 7, um mittels Röntgenbeugungsexperimenten die Struktur aufklären zu können. Hierzu sollten auch Co-Kristallisationsversuche mit Importin β unternommen werden, da auf diese Weise der sehr bewegliche Rezeptor Imp7 stabilisiert werden könnte. Zu diesem Zweck sollte eine Aufreinigungsstrategie für den Impβ/Imp7-Komplex entwickelt werden. Die Co-Kristallisation würde das Studium der Interaktion von Imp7 mit seinem Bindungspartner erlauben und so möglicherweise die Notwendigkeit eines Heterodimers in Importprozessen erklären.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Feinchemikalien

Alle Standardchemikalien, organische Substanzen besitzen den Reinheitsgrad „pro analysis“. Dabei wurde nach Möglichkeiten der günstigste Anbieter ausgewählt.

Acrylamid/Bisacrylamid-Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulphat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulphat	Roth, Karlsruhe
BisTrisPropan	AppliChem, Darmstadt
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brillant Blue G250	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
D(+)-Glucose-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Guanidiniumhydrochlorid	AppliChem, Darmstadt
Hexadecyltrimethylammoniumbromid	Fluka, Buchs
L-Histidin	Fluka, Buchs
Imidazol	AppliChem, Darmstadt
IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) dioxanfrei	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumformiat	Fluka, Buchs

di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumformiat Dihydrat	Fluka, Buchs
Magnesiumsulphat Hexahydrat	AppliChem, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MOPS (3-[N-morpholino]propansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat Trihydrat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumformiat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Nickelsulphat Hexahydrat	Fluka, Buchs
Polyethylenglykol 200, 300, 400, 600, 1000, 3000, 6000, 10000	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol 1500, 2000, 4000, 5000, 8000, 20000	Fluka, Buchs
Polyethylenglykol 3350	Sigma-Aldrich, Steinheim
pH-Pufferlösungen pH 4,01, 7,0, 9,21	Mettler-Toledo, Steinbach
Protein Assay Bradford Reagens	BioRad, München
Rubidiumchlorid	Fluka, Buchs
Salzsäure 37 %	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulphat) Ultrapure	Roth, Karlsruhe
Skim milk powder	Fluka, Buchs
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypton/Pepton	Roth, Karlsruhe
Yeast-Extract	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England

2.1.2 Größenstandards

BR(Broad range)-Protein-Standard	New England Biolabs, Frankfurt
Eigener Proteinstandard	Annette Berndt, Göttingen
DNA-Standard „1kb-ladder”	New England Biolabs, Frankfurt

2.1.3 Enzyme und Inhibitoren

BamH I	New England Biolabs, Frankfurt
Hind III	New England Biolabs, Frankfurt
Not I	New England Biolabs, Frankfurt
Xho I	New England Biolabs, Frankfurt
T_4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
Taq-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Protease Inhibitor Cocktail Tablets Complete EDTA-free	Roche, Mannheim
Aprotinin	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Roth, Karlsruhe
Pepstatin	Roth, Karlsruhe

2.1.4 Verwendete Organismen

E. coli BL21(DE3) LysE	
E. coli DH 5α	
E. coli HB 101	
E. coli HMS 174 LysS	Stammsammlung der
E. coli M15	AG Ficner und der
E. coli SG13009	AG Feußner
E. coli SG13009 (pREP4)	
E. coli TG I	
E. coli XL1-Blue	

2.1.5 Plasmide und Vektoren

pQE-9-Imp7	Prof. Dr. D. Doenecke, Göttingen
pQE-60-Impβ-no-tag	Prof. Dr. D. Görlich, EMBL Heidelberg
pQE-80Ndecahis-Imp7	Prof. Dr. D. Görlich, EMBL Heidelberg
pET-21a	Novagen Merck, Darmstadt

2.1.6 Primer

pGEXforward: 5´-GCT GGC AAG CCA CGT TTG GT-3´	MWG-Biotech, Ebersberg
pGEXreverse: 5´-CGT CTC CGG GAG CTG CAT GT-3´	MWG-Biotech, Ebersberg
pETM-70for: 5´-GGG AAT TGT GAG CGG ATA ACA ATT-3´	MWG-Biotech, Ebersberg
pETM-70rev: 5´-TCA GCG GTG GCA GCA GCC AAC TCA-3´	MWG-Biotech, Ebersberg

2.1.7 Reaktionskits

NucleoSpin Extract	Macherey-Nagel, Düren
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Sequence Mix Big Dye Terminator v1.1 sequencing kit	Applied Biosystems, Darmstadt

2.1.8 Chromatographiesäulen und Säulenmaterial

HiTrapChelating Ni-NTA-Sepharose 1 ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HiTrapChelating Ni-NTA-Sepharose 5 ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HiTrapChelating NTA-Sepharose Säulenmaterial	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HisTrapChelating Ni-NTA-Sepharose 1 ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superdex200	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DEAE-Sepharose FF	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Phenylsepharose FF	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Resource Q	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
XK 16/20	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
XK 26/60	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.9 Antibiotika

Ampicillin	Roche, Mannheim
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe

2.1.10 Kristallisationsscreens

Crystal Screens 1+2	Hampton Research, USA
Crystal Screen Lite	Hampton Research, USA
Crystal Screen Cryo	Hampton Research, USA
Crystal Screen PEG/Ion	Hampton Research, USA
JB Screens 1-10	Jena Bioscience, Jena
Magic Screen	Dr. Susana Andrade, Göttingen
Footprint Screens 1-3	Dr. Markus Rudolph, Göttingen
Structure Screens 1-3	Dr. Markus Rudolph, Göttingen
Strategy Screens 1-3	Prof. Dr. Ralf Ficner

2.1.11 sonstige Materialien

Sterilfilter	Millipore, USA
Glasgeräte	Merck, Darmstadt
Crystal Clear Tape	Henkel, Aachen
Reaktionsgefässe (0.5 ml, 1.5 ml, 2.0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefässe (15 ml, 50 ml)	Falcon, Deutschland
Deckgläschen	Kobe, Marburg
6er-Reservoir-Gewebekulturschalen	Greiner, Österreich
24Well Kristallisationsschalen sitting drop	Hampton Research, USA
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Parafilm	American National Can, USA
Pipetten (verstellbar)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Vivaspin Konzentratoren	Vivascience, Hannover

JA30-Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifugenbecher (1 l, 500 ml)	Beckman Coulter, Krefeld

2.1.12 Geräte

Äkta Prime	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Äkta Purifier	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Autoklav HST 4-5-8	Zirbus, Bad Grund
Frac-900 Fraktionierer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Unitron Schüttelinkubatoren	Infors, Einsbach
Innova 4230 Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Brutschrank Mytron	Schütt, Göttingen
Rotationsschüttler	Karl Hecht, Staufen
Gelelektrophoresekammern	Biometra, Göttingen
	BioRad, Deutschland
Sonifier 250	Branson, USA
Microtip 102 C	Branson, USA
Microfluidizer 110 S	Microfluidics, USA
Ultraschallbad Sonorex Super RK 510	Bandelin, Berlin
Zentrifuge Avanti J-20 XPI	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Avanti JA-20	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Avanti J-30 I	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Allegra 21R	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor JLA 8.1000	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor JA-20	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor JA-30.50 Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor S4180	Beckman Coulter, Krefeld
Heizbad	IKA, Staufen
Heizblock Dri-Block CB-2A	Techne, Minneapolis, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Micro centrifuge II	Sylvania, Ohio, USA
Geltrockner Gel Air Dryer	BioRad, München
Magnetrührer IKAMAG REO	IKA, Staufen

Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand, Wertheim
PCR-Geräte	Biometra, Göttingen
AbiPrism 3100 DNA Sequencer	Applied Biosystems, Darmstadt
Photometer	Biometra, Göttingen
Binokulare	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20	Carl Zeiss, Jena
Vortex	Schütt, Göttingen
GelDoc Geldokumentationsgerät	BioRad, München
pH-Meter	Beckman Coulter, Krefeld
Superloops	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Gelschüttler Promax 1020	Heidolph, Schwabach
Röntgendiffraktometer RU-H3R und Micromax 007	Rigaku, Japan

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Methoden

2.2.1.1 Mengenbestimmung von Proteinen

Die quantitative Bestimmung von Proteinlösungen erfolgt nach der Methode von Bearden (1978). In phosphosaurer Lösung lassen sich Proteine mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue anfärben. Die Proteinkonzentration kann mittels Absorption bei 595 nm photometrisch bestimmt werden, da sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffes in einem Bereich von OD_{595} 0,1 – 0,9 proportional zur Proteinkonzentration ändert.

20 µl Proteinprobe werden mit 1 ml 1:5 in Wasser verdünnter Bradfordreagens (1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G 250 in 85%iger H_3PO_4) versetzt und nach 10 Minuten die Absorption bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen. Aus dem Vergleich zu einer durch verschiedene Konzentrationen an BSA erstellten Standardkurve lässt sich die Proteinmenge der unbekannten Probe ermitteln.

2.2.1.2 Ankonzentrieren von Proteinlösungen durch Zentrifugation

Eine einfache Methode zum Ankonzentrieren von Proteinlösungen ist die Verwendung von sogenannten Centricons und Microcons. Auf einen Zentrifugenbecher ist eine Hülse gesteckt, in deren unterem Drittel eine Membran mit bestimmter Porengrösse sitzt. Diese Membran ist durchlässig für Wasser, Ionen und kleine Moleküle, aber nicht für Proteine, die größer als der Ausschluss der Membran sind. Durch Zentrifugation (3.000-4.500 x g, 4° C, Zeit unterschiedlich), können Proteine auf diese Weise ankonzentriert werden.
In dieser Arbeit wurden Vivaspin Konzentratoren der Firma Vivascience verwendet.

2.2.1.3 Gelelektrophoresen

2.2.1.3.1 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die SDS-Page nach Lämmli et al. (1970) wird zur analytischen und präparativen Auftrennung von Proteinen benutzt. Natriumdodecylsulfat ist ein Detergens, das aus einer aliphatischen Kette von 12 Kohlenstoffatomen besteht und eine hydrophile Sulfatgruppe besitzt. SDS lagert sich gleichmäßig an Aminosäuren an und denaturiert und entfaltet dabei das Protein. Zusätzlich werden Disulfidbrücken durch β-Mercaptoethanol, das im Probenpuffer enthalten ist, reduziert und dadurch gespalten. Es entsteht ein SDS-Protein-Komplex mit nach außen gerichteten negativen Ladungen. Die Eigenladungen des Proteins sind jetzt vernachlässigbar und der entstandene Komplex besitzt ein konstantes Masse/Ladungs-Verhältnis. Unter diesen Bedingungen sind Proteine unabhängig von ihrer Faltung in einem Molekularsieb wie dem Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht separierbar.

Das Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese beruht auf der Fokussierung von Proteinen durch einen pH-Sprung von zwei übereinander geschichteten Polyacrylamidgelen. Das untere Trenngel enthält einen Puffer mit einem pH Wert von 8,8 und einem Leition hoher Ionenbeweglichkeit. Der pH Wert des darübergeschichteten Sammelgels liegt deutlich tiefer bei 6,8. Das Leition des Sammelgels besitzt geringere Ionenbeweglichkeit. Der Elektrodenpuffer enthält ein Folgeion geringer Ionenbeweglichkeit, dessen Ladung allerdings pH-abhängig ist.
Durch das Einschalten des Stromes wandern die Leitionen des Laufpuffers mit hoher Geschwindigkeit durch das elektrische Feld und überholen dabei die aufgetragenen Proteine. Daraus resultiert hinter den Proteinen eine Zone geringerer Ionendichte und erhöhter Feldstärke,

aufgrund dessen die Proteine und Folgeionen beschleunigt werden. Die Geschwindigkeit der Proteine ist dabei größer als die der Folgeionen, aber langsamer als die der Leitionen. Es resultiert die Fokussierung der Proteine als scharfe Bande an dem Feldstärkesprung.
Beim Auftreffen auf das Trenngel ändern die Folgeionen aufgrund des erhöhten pH-Wertes ihre Ladung und damit ihre Ionenbeweglichkeit. Sie überholen die Proteine, die dann wieder in einem Gebiet konstanter Feldstärke wandern. Die Folge ist eine normale Gelelektrophorese. Das Trenngel wirkt als Molekularsieb, da die Proteine durch die weit engeren Poren des Trenngels in Abhängigkeit ihrer Masse verlangsamt werden und so nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Für die Vorbereitung einer SDS-PAGE werden zwei Glasplatten mit Ethanol gereinigt und staubfrei trockengerieben. Zwei 1 mm dicke Abstandshalter werden an den Rändern platziert und eine dünne Gummidichtung wird U-förmig zwischen die Glasplatten gebracht. Die Glasplatten werden dort, wo die Gummidichtung liegt, geklammert. Jetzt wird das Trenngel zwischen die Glasplatten zu ¾ Höhe gegossen und für die Dauer der Polymerisation mit wasser-gesättigtem Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren wird das Isopropanol abgegossen und mit Wasser nachgespült. Das Sammelgel wird in das obere Viertel gegossen und schließlich der Kamm zwischen die Glasplatten gesteckt.

Die Gummidichtung wird nach Abschluss des Polymerisationsvorganges entfernt, das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt und oberes und unteres Reservoir mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Der Kamm wird vorsichtig gezogen und die Probentaschen mit Puffer gespült, um Gelreste zu entfernen. Die Proteinproben werden 1:1 (v/v) mit Laemmli-Puffer versetzt, bei 95°C für drei bis fünf Minuten aufgekocht und in die Taschen des Gels geladen. Für die Analyse von Zellsuspensionsproben mittels SDS-PAGE wird 1 ml Kultur abzentrifugiert, mit OD x 0.2 ml 2xLaemmli-Puffer versetzt und anschließend 10 min bei 95° C aufgekocht. Für den Größenvergleich wird ein Proteingrößenstandard mit aufgetragen. Nach dem Auftragen auf das Gel werden die Proteine bei einer geringen Stromstärke (ca. 25-30 mA) im Sammelgel zu einer schmalen Bande fokussiert und dann separiert.

Trenngelpuffer (5x):	**Sammelgelpuffer (5x):**
1,88 M Tris/HCl pH 8,8	0,625 M Tris/HCl pH 6,8
0,5 % (w/v) SDS	0,5 % (w/v) SDS

Proteinlaufpuffer:

192 mM Glycin

25 mM Tris/HCl pH 8,3

0,1 % (w/v) SDS

2x SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer):

62,5 mM Tris/HCl pH 6,8

70 mM SDS

50 % (v/v) Glycerin

0,1 % (v/v) Bromphenolblau

(Stammlösung 1 % v/v in EtOH abs.)

5 % (v/v) β-Mercaptoethanol

Ansatz für ein Sammelgel, Volumen = 2 ml

Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	0,33 ml
Ammoniumperoxodisulphat	10 µl
TEMED	2 µl
Aq. bidest.	1.26 ml
Trenngelpuffer	0,4 ml

Ansatz für ein Trenngel, Volumen = 6 ml

Geldichte des Trenngels	**10 %**	**15 %**
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	2 ml	3 ml
Ammoniumperoxodisulphat	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Aq. bidest.	2,8 ml	1,8 ml
Trenngelpuffer	1,2 ml	1,2 ml

2.2.1.3.2 Agarosegelelektrophorese von Nucleinsäuren

Zur präparativen Reinigung und zur Analyse von DNA wird die Agarosegelelektrophorese benutzt. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente werden die Agarosegele mit 0,5 bis 2,0% Agarosegehalt in 1x TBE-Puffer hergestellt. Die abgewogene Agarose wird mit TBE-Puffer versetzt und zum Lösen in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Für das Gel wird eine Flachbettkammer abgedichtet und die handwarme Agaroselösung hineingegossen. Luftblasen werden entfernt und ein Probenkamm wird in das Gel gesteckt. Nach etwa einer Stunde ist das Gel erstarrt und wird in eine mit 1x TBE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt.

Zum Laden der DNA Proben werden diese mit Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 12 mA/cm^2 Gelfläche.

TBE-Puffer (10x) 1 Liter:

108 g	TrisBase
55	Borsäure
40 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1 l	H_2O

Agarosegel-Probenpuffer (10x):

0,5% (w/v)	Bromphenolblau
0,5 % (w/v)	Xylencyanol FF
60% (v/v)	Glycerin

2.2.1.4 Detektion von Proteinen und Nucleinsäuren

2.2.1.4.1 Anfärben von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine können mit Coomassie Brilliant Blue G 250 sichtbar gemacht werden, wobei die Nachweisgrenze 0.3 µg Protein/Bande beträgt. Das Gel wird nach der Elektrophorese im Coomassie-Färbebad mindestens 30 min inkubiert, intensivere Banden können mit mehrmaliger Färbung und Entfärbung oder einer Färbung über Nacht erzielt werden. Anschließend wird das Gel unter mehrfachem Erneuern des Entfärbebads mehrere Stunden entfärbt. Gestoppt wird der Entfärbevorgang mit 5% Essigsäure oder Wasser.

Färbebad:

0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250
0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250
40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

Entfärber:

40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

2.2.1.4.2 Anfärben von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid

Elektrophoretisch aufgetrennte Nukleinsäuren können mit Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Hierzu wird das Gel 15-20 min im Ethidiumbromidbad inkubiert und anschließend unter UV-Licht bei 254 beziehungsweise 365 nm detektiert. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert dabei intensiv orange. Bei 365 nm wird vor allem DNA detektiert, die noch für weitere Reaktionen zur Verfügung stehen soll,

also z. B. durch Restriktionsverdau gewonnene DNA-Fragmente. Durch längere Wellenlängen wird die Mutatiosrate herabgesetzt.

2.2.1.5 DNA-Elution aus Agarosegelen

Diese Methode eignet sich, um 70 bp bis 10 kb lange DNA aus niedrig-schmelzenden Standard-Agarosegelen zu eluieren und zu reinigen. In dieser Arbeit wurde dazu das „NucleoSpin Extract"-Kit der Firma Macherey-Nagel benutzt. Die DNA durch Ethidiumbromid angefärbte DNA (vgl. 2.2.1.4.2) wird zunächst aus dem Agarosegel ausgeschnitten, dann aus der Agarose herausgelöst, anschließend an eine Säule gebunden, gewaschen und von der Säule eluiert. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.
Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektorsysteme ist diese Methode nützlich, da elektrophoretisch aufgetrennte DNA aus den Agarosegelen ausgeschnitten und so aufgereinigt werden kann. Bei den ausgeschnittenen DNA-Banden handelt es sich um bereits mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA-Inserts und Vektoren, die von ungeschnittener und einfach geschnittener DNA getrennt wurden.

2.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration wässriger Nukleinsäurelösungen wird quantitativ im Photometer bei 260 nm gegen einen Leerwert bestimmt (nach Sambrook et al., 1989). Folgende Umrechnungswerte werden hierbei herangezogen:
1 A (260) = 50 µg/ml doppelsträngige DNA
1 A (260) = 40 µg/ml einzelsträngige DNA
1 A (260) = 33 µg/ml Oligonukleotid

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wird über den Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt.
Während die aromatischen Basen der Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum von 260 nm und ein Halbmaximum bei 280 nm besitzen, absorbiert Tryptophan, eine aromatische Aminosäure der Proteine, vor allem im Bereich von 280 nm. Reine DNA liegt bei einem Quotienten von 1,8 bis 2,0 vor. Mit Proteinen verunreinigte DNA-Lösungen besitzen einen kleineren A260/ A280 Quotienten.

2.2.1.7 Trocknen von Polyacrylamidgelen zwischen zwei Cellophanfolien

Polyacrylamidgele können zu Dokumentationszwecken auch zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet werden. Dazu wird auf einen Spannrahmen zunächst eine in Wasser eingeweichte Cellophanfolie gelegt, dann das Polyacrylamidgel und anschließend eine zweite in Wasser eingeweichte Cellophanfolie. Das Gel muß gut entsalzt sein, da sonst Verfärbungen auftreten. Zwischen Gel und den Folien sowie zwischen beiden Folien soll sich keine Luftblase befinden, um ein Einreißen des Gels zu vermeiden. Nun wird ein zweiter Rahmen auf die Folien gelegt und mit Klammern fixiert. Im Geltrockner bei etwa 70° C in heißer Umluft ist das Gel nach zwei Stunden getrocknet. Bei Raumtemperatur ist das Gel nach 20 Stunden trocken und kann aus den Rahmen genommen und archiviert werden.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Klonierung von Proteinen in Expressionsvektoren

Plasmide sind bei Bakterien natürlich vorkommende ringförmige DNA-Moleküle, die zusätzliche Gene tragen und zwischen Bakterien ausgetauscht werden können. Es ist auch möglich, solche Plasmide zu modifizieren und in Bakterien zu einzuschleusen.
Bei Klonierungen wird das Zielgen zunächst amplifiziert und anschließend in einen geeigneten Vektor gebracht. Das daraus resultierende Plasmid besitzt für die nachfolgende Expression der eingebrachten Gene wichtige Eigenschaften, wie zum Beispiel einen induzierbaren Promotor für eine gerichtete Expression, Gene für die Inaktivierung von Antibiotika und schließlich das Zielprotein. Wichtig bei Klonierungen ist, dass das Zielgen im Leseraster liegt.
Für die Proteinexpression beliebte Vektoren sind solche, die aufwärts vom einklonierten Gen eine codierende Sequenz für ein Peptid oder Protein besitzen, das die spätere Proteinaufreinigung erleichtert. Solche Konstrukte sind z. B. N-terminale GST-Fusionsproteine in pGEX-Vektoren, N-terminale MBP-Fusionsproteine in pMAL-Vektoren oder N- oder C-terminale His-Sequenz-Proteine in einigen pQE- oder pET-Vektoren.

2.2.2.1.1 DNA-Amplifizierung durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) ist eine 1984 von Kary Mullis entwickelte Methode, um DNA-Sequenzen spezifisch zu amplifizieren. Für die PCR werden kurze, die gewünschte Sequenz flankierende 3‘- und 5‘-DNA-Oligonukleotide, kurz: Oligos, von etwa 20 bis 30 Basenpaaren Länge benötigt, sog. „primer“, die den Anfangs- beziehungsweise Endpunkt der Sequenz definieren und als Startpunkt für das Enzym DNA-Polymerase dienen. Zur Durchführung der PCR werden zu einer DNA-Lösung, die die Zielsequenz besitzt, ein Paar von Primern, alle vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) und eine hitzestabile DNA-Polymerase, z. b. aus *Thermus aquaticus*, gegeben.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten:

- Spaltung der DNA-Doppelhelix: für die Hitzedenaturierung der DNA wird das Reaktionsgemisch auf 95°C erhitzt. Die beiden komplementären DNA-Stränge werden voneinander getrennt.
- Hybridisierung der Primer mit der DNA („annealing“): der PCR-Ansatz wird auf eine Temperatur gesenkt, die etwa 3° C unter den Schmelzpunkten der Primer liegt, um ein optimales, weil hochspezifisches Hybridisieren der Primer mit der DNA zu gewährleisten.
- DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase: die optimale Temperatur für die verwendete Taq-DNA-Polymerase liegt bei 72°C. Die Elongationszeit hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragments ab und sollte bei etwa 1 min pro 1000 Basenpaaren liegen.

Diese drei Schritte laufen mehrmals hintereinander ab, um eine ausreichende Menge an PCR-Produkt zu erhalten. Die bereits entstandenen DNA-Stränge dienen in den Folgezyklen wiederum als Matrizen, so dass die Vermehrung der zu amplifizierenden DNA-Sequenz exponentiell zunimmt.

Für die Klonierung in Vektoren enthalten die Primer normalerweise bereits die Sequenzen für die 5‘ und 3‘ Restriktionsschnittstellen, mit deren Hilfe das korrekte Einpassen der DNA-Sequenz in den Zielvektor gelingt. Bei der Subklonierung eines Gens von einem Vektor in den anderen können diese Restriktionsschittstellen für den Zielvektor entweder durch Primer in der PCR eingeführt werden oder sie werden durch einen Zwischenklonierungsschritt aus einem weiteren Vektor in den Zielvektor „eingeschleppt“.

Um den korrekten Einbau eines Inserts in einen Vektor nach einer erfolgreichen Transformation eines Bakterienstammes mit diesem Vektor zu untersuchen, wird eine Kolonie-PCR durchgeführt.

Die einzelnen transformierten Kolonien auf einer Selektionsplatte können so auf das richtige Insert gescreent werden.

Für einen typischen PCR-Ansatz für einen Kolonie-Screen wird pipettiert:

0,5 µl	5´-Primer 10 mM
0,5 µl	3´-Primer 10 mM
0,5 µl	dNTPs 100 mM
2,5 µl	Taq-Polymerase-Puffer (10x)
0,25 µl	Taq-Polymerase 5 U/µl
20.75 µl	H_2O
+	Kolonie auf der Spitze eines Zahnstochers

Die PCR zur Amplifizierung von Importin 7 wurde im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

1. Denaturierung	94° C	5 min	
2. Denaturierung	94° C	30 s	
3. Hybridisierung	52° C	30 s	
4. Elongation	72° C	3 min	Schritte 2-4 10x wiederholen
5. Denaturierung	94° C	30 s	
6. Hybridisierung	52° C	30 s	
7. Elongation	72° C	3 min + 5 s/Zyklus	Schritte 5-7 15x wiederholen
8. Elongation	72° C	10 min	
9. Hold	4° C		

Da Imp7 in pQE-9 über eine N-terminale BamH I- und eine C-terminale Hind III-Schnittstelle einkloniert ist und sonst keine weiteren Restriktionsschnittstellen vorhanden sind, wurde in dieser Arbeit ausgehend vom Vektor pQE-9-Imp7 die Imp7-DNA-Sequenz in den Vektor pET-21a kloniert, um neue Schnittstellen für weitere Subklonierungen zu erhalten.

2.2.2.1.2 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen erkennen spezifische Basensequenzen in DNA-Doppelhelices und hydrolysieren die Phosphodiesterbindungen an spezifischen Stellen.

Man findet diese Enzyme in Prokaryoten, dort dienen sie dem Abbau von Fremd-DNA, die eigene DNA bleibt aufgrund eines bestimmten Methylierungsmusters ungespalten.
Restriktionsendonucleasen haben für das Klonieren von DNA große Bedeutung gewonnen. Ihre bemerkenswerteste Eigenschaft besteht darin, Sequenzen mit zweifacher Rotationssymmetrie, sogenannte Palindrome, zu erkennen und so zu spalten, dass überhängende DNA-Enden, „sticky ends“ entstehen. Diese überhängenden DNA-Enden hybridisieren leicht mit komplementären Enden und ermöglichen so das gerichtete Einklonieren in mit den gleichen Enzymen ebenfalls zu „sticky ends“ geschnittene Vektoren.
Die Restriktionsanalyse von Plasmiden aus „Midi-“ und „Maxi-Preps“ (vgl. 2.2.4.3) dient der Grössenanalyse der vorhandenen Fremdgene.

Ein typischer Ansatz von 20 µl enthält:

1 µg	DNA
2 µl	Restriktionsenzympuffer (10x)
0,5 µl (entspricht 1 U)	Restriktionsendonuclease für 3’ Schnittstelle
0,5 µl (entspricht 1 U)	Restriktionsendonuclease für 5’ Schnittstelle
0,2 µl	BSA (100x) (wird nur bei einigen Enzymen benötigt)
	H_2O
ad 20 µl	

Der Ansatz wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die geschnittenen Fragmente im Agarosegel (vgl. 2.2.1.4.2) analysiert und gegebenenfalls für folgende Klonierungen aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert (vgl. 2.2.1.5).

2.2.2.1.3 Ligation eines verdauten DNA-Fragments in einen Zielvektor durch DNA-Ligasen

Ligasen katalysieren die Phosphodiesterbildung benachbarter Nucleotide eines DNA-Stranges. In der Natur spielen sie deshalb bei der DNA-Replikation eine entscheidende Rolle. Sie verknüpfen z. B. die Okazaki-Fragmente eines zum Mutterstrang neu gebildeten, komplementären Tochterstranges.
In der Molekularbiologie werden sie dazu benutzt, komplementäre sticky ends von DNA-Fragmenten nach der Hybridisierung der überhängenden Enden zu verknüpfen.

Sie ermöglichen auf diese Weise das Einklonieren von Genen in ein geschnittenes Plasmid.

Ein typischer Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

0,2 µl	T_4-DNA-Ligase (10 U/µl)
2 µl	geschnittener Vektor
6 µl	Insert
2 µl	T_4-DNA-Ligase-Puffer (10x)
ad 20 µl	H_2O

2.2.2.2 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA wird mit der didesoxy-Methode nach Sanger (1977) durchgeführt. Dabei werden bei der Amplifikation der zu sequenzierenden DNA in einer PCR Kettenabbrüche der Polymerase-Reaktion durch den zufälligen Einbau eines ddNTPs (didesoxy-Ribonucleosidtriphosphat) erzeugt. Hierzu werden vier PCR-Ansätze mit dNTPs versetzt. Eines der vier liegt jedoch nicht als dNTP, sondern als ddNTP vor. Da hier die 3´-OH-Gruppe fehlt, kommt es zum Kettenabbruch. Der Statistik folgend ist damit jedes mögliche auf das entsprechende ddNTP-endende Fragment im jeweiligen Reaktionsansatz vorhanden. Durch einen Längenabgleich der Fragmente aus den vier Reaktionsansätzen kann so die Sequenz abgeleitet werden. Mit dem Seq-Mix BigDye Terminator v1.1 von Applied Biosystems kann die komplette Reaktion in einem einzigen Ansatz durchgeführt werden.

Für einen typischen Sequenzierungsansatz werden pipettiert:

200 ng	Template
8 pmol	Primer
1 µl	Seq-Mix
ad 10 µl	H_2O

Das PCR-Programm für Sequenzierungsreaktionen ist dem unter 2.2.4.1.1 genannten Programm analog. Die Annealing-Temperatur ist abhängig von den verwendeten Sequenzierprimern, die Elongationszeit von der Länge des zu sequenzierenden DNA-Fragments.

Nach der PCR werden die Produkte für den Sequenzierungsautomaten aufgereinigt, um störende Faktoren wie Primer und Polymerase zu entfernen.

Hierzu wird dem Ansatz hinzupipettiert:

1 µl 125 mM EDTA

1 µl 3 M NaAc

50 µl Ethanol abs.

Der Ansatz wird vorsichtig durch leichtes Antippen mit der Fingerspitze durchmischt, für 5 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (20.000 x g, 15 min, 4° C).
Der Überstand wird abgenommen, das Pellet in 70 µl Ethanol 70 % gewaschen.
Es folgt eine weitere Zentrifugation (20.000 x g, 5 min, 4° C).
Das Pellet wird 2 min an der Luft getrocknet und schließlich in 30 µl HPLC-Wasser aufgenommen.
Die gereinigten DNA-Fragmente wurden in dieser Arbeit in einem Kapillarsequenzierer von Applied Biosystems analysiert

2.2.2.3 Plasmidpräparationen

2.2.2.3.1 Plasmidpräparation im mittleren Maßstab

Für die Vermehrung und Isolierung von DNA in mittlerem Maßstab, um klonierte Plasmide für Expressionsetablierungen zu erhalten, werden Midi-Präparationen (kurz: „Midi-Preps“) durchgeführt. Dabei werden 100 ml einer *E.coli*-Übernachtkultur aufgeschlossen und die DNA präpariert. In dieser Arbeit wurde das Plasmid Midi Kit von Qiagen benutzt und die DNA nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.2.3.2 Plasmidpräparation im großen Maßstab

Bei Maxi-Präparationen (kurz: „Maxi-Preps“) werden Plasmide aus einer 250 ml *E.coli*-Übernachtkultur isoliert. Für Maxi-Preps wurde das Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet. Dabei wurde nach den Angaben zur Isolation im Benutzerhandbuch des Herstellers verfahren.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

E.coli Zellen enthalten nach der Transformation einen Vektor, der ein einkloniertes Fremdgen sowie ein oder mehrere Gene für Antibiotikaresistenzen enthält. Die Antibiotikaresistenzen auf dem eingebrachten Plasmid ermöglichen das Wachstum der plasmidtragenden Bakterien auf einem antibiotikahaltigem Medium, das gleichzeitig wachstumshemmend oder letal auf andere Bakterien, die das Plasmid nicht enthalten, wirkt. So können plasmidtragende Bakterien durch Antibiotika positiv selektiert und Kontaminationen mit fremden Bakterien vermieden werden. Das einklonierte Fremdgen ist bei den hier verwendeten Plasmiden so lokalisiert, dass die Expression unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Lac-Promotors, z. B. T5 oder T7, liegt und gleichzeitig das Gen im offenen Leserahmen zu liegen kommt. Das eingebrachte Plasmid erlaubt unter diesen Bedingungen die selektive Expression des klonierten Fremdgens.
Einige der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme benötigen zusätzlich zu den Selektionsantibiotika, die für die Expression benötigt werden, Kanamycin für den Erhalt des pREP4-Plasmides, das für einen Promotorrepressor codiert. Diese senken die Basisexpression und verhindern so die Vermehrung von im Wachstum begünstigten Deletionsmutanten.

2.2.3.2 Medien zur Aufzucht von *E. coli*

LB-Medium:

10 g Bacto-Tryptone
5 g Bacto-Yeast extract
10 g NaCl
in 900 ml H_2O, pH mit NaOH auf 7,0 einstellen
ad 1 l H_2O.

2YT-Medium:

16 g Bacto-Tryptone
10 g Bacto-Yeast extract
5 g NaCl
in 900 ml H_2O, der pH wird mit 1 M NaOH auf 7,0 eingestellt,
ad 1 l H_2O.

Die Sterilisation erfolgt durch Autoclavieren, die Lagerung bei Raumtemperatur.

LB-Agar für Selektionsplatten:

250 ml LB-Medium

3 g Agar-Agar

Der Agar wird durch Erhitzen gelöst, sobald der LB-Agar auf etwa 42-45° C abgekühlt ist, werden

40 mg Ampicillin beziehungsweise

20 mg Kanamycin

unter Rühren zugegeben. Nun wird der LB-Agar in Platten gegossen.

Sollen die LB-Agar-Platten nicht selektiv sein, so wird auf den Zusatz von Antibiotika verzichtet.

Die Lagerung erfolgt bei 4° C.

2.2.3.3 Transformationen in Bakterienstämme

2.2.3.3.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von *E. coli* mit einem gewünschten Vektor muß der entsprechende Bakterienstamm zuerst kompetent für die Aufnahme von Plasmiden gemacht werden. Dabei wird die Zellmembran des Bakteriums durch eine chemische Behandlung perforiert. Durch diese poröse Membran können nun Plasmide in das Bakterium eingeschleust werden.

Zunächst wird ein Aliquot des Stammes, der kompetent gemacht werden soll, auf einer antibiotikafreien LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

Eine Kolonie wird in 5 ml LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37° C inkubiert.

Die 5 ml-Vorkultur wird 1:100 in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37° C bis zu einer OD_{600} von 0,6 wachsen gelassen.

Die Ernte erfolgt durch Zentrifugieren (3.000 g, 10 min, 4° C).

Das Pellet wird in 150 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert.

Nach einer weiteren Zentrifugation (6.000 g, 10 min, 4° C) wird das Pellet in 5 ml eiskaltem TFB2-Puffer vorsichtig resuspendiert.

Die kompetenten Zellen werden nun unter Kühlung durch flüssigen Stickstoff aliquotiert. Die Lagerung erfolgt bei -80° C.

TFB1-Puffer:

30 mM	KAc pH 7,0
50 mM	$MnCl_2$
10 mM	$CaCl_2$
100 mM	$RbCl_2$
15 % (v/v)	Glycerin

Der pH wird mit 0,2 M HAc auf 5,8 eingestellt.
Es folgt Sterilfiltration.

TFB2-Puffer:

10 mM	NaMOPS pH 7,2
75 mM	$CaCl_2$
10 mM	$RbCl_2$
15 % (v/v)	Glycerin

Der pH wird mit 1 M NaOH auf 6,5 eingestellt.
Es folgt Sterilfiltration.

2.2.3.3.2 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Unter Transformation versteht man das Einschleusen von Plasmid-DNA in Bakterienzellen. Zu 50 µl kompetenter Zellen werden 20 µl Ligationsansatz oder 1 µg Plasmid-DNA pipettiert und gemischt. Die Zellen werden dann 20 Minuten auf Eis inkubiert. Für die DNA-Aufnahme werden die Zellen bei 42°C für 60 Sekunden inkubiert und anschließend 2 Minuten auf Eis belassen. Nach Zugabe von 950 µl antibiotikafreiem LB-Medium werden die Zellen 60 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 50 µl, 100 µl und 200µl des Transformationsansatzes werden je auf einer Selektionsplatte ausgestrichen, an der Luft getrocknet und die Platten umgedreht über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.3.4 Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

2.2.3.4.1 Anzucht einer Vorkultur

Für eine Bakterienkultur, die zur Überexpression von rekombinanten Proteinen herangezogen werden soll, wird zunächst eine Vorkultur angezogen. In einem Reagenzglas werden 10 ml LB-Medium mit den Selektionsantibiotika versetzt und mit einem Abstrich einer bewachsenen Agarplatte angeimpft. Bei 37°C wird die Kultur schüttelnd für 14 bis 16 Stunden inkubiert.

2.2.3.4.2 Anzucht einer Expressionskultur

Im Allgemeinen wird LB-Medium im gewünschten Endvolumen, z. B. 1 Liter, mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit einer vorbereiteten *E. coli* Starterkultur (ebenfalls in LB-Medium mit Antibiotika) 1:30 bis 1:100 angeimpft.

Im Schüttler werden die Zellen bei 37°C, dem Temperaturoptimum für *E. coli*, bis zu einer OD_{600} von etwa 0,5-0,7 wachsen gelassen. Zur Induktion der Proteinexpression wird die Zellsuspensionen mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 bis 1mM versetzt. Nun werden die Zellen weiter schüttelnd inkubiert bis eine OD_{600} von 1,5-2,0 erreicht ist (etwa 3-4 Stunden). An diesem Punkt verläßt die Kultur den logarithmischen Wachstumsbereich und geht in die stationäre Phase über. Bei Verwendung von 2YT-Medium ist aufgrund des höheren Nährstoffangebots dieser Punkt erst später, bei einer OD_{600} von 3-4 erreicht. Die Zellen werden bei 8000 x g und 4° C 15 Minuten lang abzentrifugiert, anschließend einmal mit eiskaltem Lysispuffer (z. B. PBS) gewaschen und das Pellet bis zur Proteinaufreinigung bei –20° C gelagert.
Einige Proteine akkumulieren in *E. coli* in sogenannten Zelleinschlusskörperchen (engl. inclusion bodies). Es gibt mehrere Möglichkeiten, dies zu vermeiden.
Zunächst kann die Induktionstemperatur gesenkt werden, um eine niedrigere Expressionsrate zu erreichen. Zusätzlich kann 2% Glucose zugegeben werden, um die Basisexpression des Zielproteins zu reprimieren. Da nämlich das einklonierte Gen unter der Kontrolle eines Lac-Promotors liegt, wirkt ein Abbauprodukt der Lactose, wie z. B. Glucose, inhibierend auf die Repressorfreisetzung vom Promotor vor dem eigentlichen Gen. Schließlich können andere Expressionsstämme getestet werden.

Folgende Expressionsvektoren wurden in verschiedene Wirtsstämme transformiert:

exprimiertes Protein	**Expressionsvektor**	**Antibiotikaresistenz**
$N(His)_6$-Imp7	pQE-9	Ampicillin
$N(His)_{10}$-Imp7	pQE-80N	Ampicillin
$N(His)_6$-Impβ	pQE-60	Ampicillin
Impβ ohne Affinitätssequenz	pQE-60	Ampicillin

2.2.3.5 Aufschliessen von *E .coli*-Zellen

Um rekombinante Proteine aus Bakterienzellen zu isolieren, müssen die Zellen geerntet und aufgebrochen werden. Die Ernte erfolgt durch Zentrifugation (6.000 x g, 20 min,
4° C) und einmaligem Waschen in eiskaltem Lysispuffer mit anschließender Zentrifugation (6.000 g, 20 min, 4° C). Der Zellaufschluss kann mechanisch im Fluidizer oder durch Schockgefrieren, chemisch durch Zusatz von Lysozym oder physikalisch durch Ultraschall erfolgen.

In dieser Arbeit wurden die Bakterienzellen generell im Fluidizer oder durch die Kombination von Fluidizer- und Ultraschallbehandlung im Sonifier aufgeschlossen.
Ein Zellpellet aus 1 l Schüttelkultur (vgl. 2.2.2.4.2) wird in 30 ml Lysispuffer aufgetaut und resuspendiert. Die Zusammensetzung des Lysispuffers richtet sich nach den Erfordernissen des ersten Aufreinigungsschrittes (vgl. 2.2.3.1). Um proteolytische Enzyme zu inaktivieren wird vor dem Auftauen eine halbe Tablette Protease Inhibitor Cocktail Complete EDTA-free in den Lysispuffer gegeben.
Der Zellaufschluß im Fluidizer wird bei 80-90 psi in 4-5 Zyklen durchgeführt. Beim Aufschluß im Sonifier wird die Zellsuspension auf Eis dreimal für eine Minute sonifiziert. Dabei werden folgende Einstellungen verwendet: duty cycle 50%, output control 7. Wenn sowohl Sonifier als auch Fluidizer benutzt werden, wird erst mit Ultraschall, dann im Fluidizer aufgeschlossen.
Nach dem Aufschluss der Zellen wird die Suspension in JA30-Zentrifugenröhrchen überführt und ultrazentrifugiert (100.000 x g, 60 min, 4° C). Nach der Trennung des Lysats in Zelltrümmer und Überstand wird mit dem Überstand je nach Art des rekombinanten Proteins unterschiedlich verfahren (vgl. hierzu Aufreinigung von His-markierten Proteinen und Proteinen ohne Affinitätssequenz).

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Chromatographische Trennmethoden

2.2.4.1.1 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf spezifischen und reversiblen Interaktionen von Säulenmatrix und Molekül. Abhängig von der Beschaffenheit des Säulenmaterials und der Probe adsorbieren Moleküle an die Matrix.
Das Adsorbens kann von der Säule durch kompetitive Verdrängung, Konformationswechsel durch pH-Wertänderung oder durch Änderung der Ionenstärke eluiert werden. Die Affinitätschromatographie stellt eine sehr spezifische und selektive Trennmethode für Biomoleküle dar.

2.2.4.1.1.1 Affinitätschromatographische Trennung von Proteinen mit 6xHis-Sequenz über Ni-NTA-Sepharose

Proteine, die mit N- oder C-terminaler His-Sequenz exprimiert wurden, lassen sich selektiv über eine Affinitätschromatographie mittels immobilisierter Metallchelatkomplexe aufreinigen (IMAC, engl. immobilized metal chelating affinity chromatography). Hierbei bilden zwei Histidine über die freien Elektronenpaare ihrer Stickstoffe koordinative Bindungen zu einem immobilisierten Metallion aus. Dabei bildet sich ein Chelatkomplex, der kompetitiv durch Imidazol aufgelöst werden kann. Die Metallionen (z. B. Ni oder Co) müssen zweiwertig sein und sind meistens an NTA(Nitrilotriessigsäure)-Sepharose gebunden. Bei der IMAC dürfen die verwendeten Puffer weder DTT noch EDTA enthalten, da chelatkomplexbildende Substanzen die Kopplung der Proteine stören. Anstelle von DTT wird daher β-Mercaptoethanol eingesetzt.
In dieser Arbeit wurden für die Aufreinigung von Proteinen mit His-Sequenz die HiTrapChelating Ni-NTA-Sepharose-Säulen von Amersham Pharmacia Biotech benutzt.
Als Metallion wird Nickel benutzt, das über vier koordinative Bindungen an NTA gebunden ist. NTA ist kovalent an die Sepharose-Trägermatrix gebunden. Für die Affinitätschromatographien mit Ni-NTA-Sepharose wurden Äkta-Purifier-HPLCs benutzt.
Nach dem Laden der Proteinprobe auf die Säule über einen 50 ml-Superloop wird mit vier Säulenvolumina 20 mM Imidazol im Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Anschließend wird über einen aufsteigenden Imidazolgradienten eluiert. Das Eluat wird fraktioniert und die Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proben, die das Zielprotein enthalten, werden gepoolt. Der Pool wird für weitere Aufreinigungsschritte bei 4° C gelagert.

Wasch-/Bindungspuffer:		**Elutionspuffer:**	
20 mM	Tris/HCl pH 7,5	20 mM	Tris/HCl pH 7,5
300 mM	NaCl	300 mM	NaCl
20 mM	Imidazol	400 mM	Imidazol
2 mM	β-Mercaptoethanol	2 mM	β-Mercaptoethanol

2.2.4.1.1.2 Affinitätschromatographische Trennung von Proteinen mit 10xHis-Sequenz über Ni-NTA-Sepharose

Für die Aufreinigung von Proteinen mit 10xHis-Sequenz werden dem Überstand nach der Zentrifugation des Zellysats 20 mM Imidazol zugesetzt.

Da Imidazol stark basisch ist, muß anschließend der pH-Wert auf 7,5 eingestellt werden. Das weitere Verfahren ist der Aufreinigung von Proteinen mit 6xHis-Sequenz analog, außer dem Elutionspuffer. Anstatt 400 mM Imidazol enthält er 500 mM Imidazol.

2.2.4.1.2 Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie werden geladene Moleküle nach ihrer Ionenstärke bei einem bestimmten pH-Wert aufgetrennt. Die Trägermatrix der Chromatographiesäule bietet dabei Gegenionen als Bindungspartner für die aufzutrennenden Moleküle an. Die Auftrennung erfolgt über kompetitive Verdrängung der Probemoleküle durch stärkere Ionen im Elutionspuffer. Bei Kationentauschern werden Kationen wie Na^+ oder $(NH_4)^+$ verwendet, bei Anionentauschern Cl^- oder SO_4^{2-} Schwach geladene Moleküle eluieren früher als stark geladene. Auf diese Weise können z. B. Proteine nativ nach ihrem isoelektrischen Punkt pI getrennt werden.

2.2.4.1.2.1 Anionenaustauschchromatographie über DEAE-Sepharose zur Trennung geladener Proteine

Der Substituent der DEAE-Sepharose, eine Diethylaminoethylgruppe, besitzt relativ schwache kationische Eigenschaften, da der positiv geladene Stickstoff von positiv-induktiven Effekten seiner der Ethylgruppen profitiert. Die Bindung von Anionen ist deshalb eher schwach und besonders selektiv. Daher eignet sich die DEAE-Sepharose gut für den ersten Aufreinigungsschritt eines Proteins ohne Affinitätssequenz, wenn noch sehr viele Verunreinigungen in der Probe sind. Schwach geladene Moleküle, d. h. solche, deren pI knapp über dem Puffer-pH (zwischen 0 und 1 pH-Einheiten darüber) liegt, eluieren früher, stärker geladene, d. h. jene, deren pI den Puffer-pH deutlich übersteigt, eluieren später. Entscheidend für eine erfolgreiche Aufreinigung ist daher die Wahl des pH-Wertes im Elutionspuffer, der etwa eine pH-Einheit über dem pI des aufzureinigenden Proteins sein sollte. Die hier verwendete DEAE-Sepharose FF von Amersham Pharmacia Biotech wurde in eine XK16/20-Säule gepackt.
Vor der Benutzung wird mit 5 Säulenvolumina Startpuffer äquilibriert und anschließend mit einem steigenden Salzgradienten eluiert. Es werden 5 ml-Fraktionen gesammelt, die später via SDS-PAGE analysiert werden. Die Fraktionen mit dem gesuchten Protein werden gepoolt und für weitere Aufreinigungsschritte bei 4° C aufbewahrt.

Puffer für die Aufreinigung von Importin β:

Startpuffer:		**Elutionspuffer:**	
20 mM	BisTris/HCl pH 6,2	20 mM	BisTris/HCl pH 6,2
100 mM	NaCl	1 M	NaCl
2 mM	β-Mercaptoethanol	2 mM	β-Mercaptoethanol

2.2.4.1.3 Ausschlusschromatographie (Gelchromatographie, Gelfiltration, size exclusion)

Die Ausschlusschromatographie (Gelfiltration) trennt gelöste Moleküle nach ihrer Grösse auf. Die hierbei verwendeten Chromatographiesäulen bestehen aus einem porösen Gelmaterial mit definierter Porengröße. Das Trennverhalten basiert auf dem unterschiedlichen hydrodynamischen Volumina der Probenmoleküle. Je nach Molekülgröße, Molekülgestalt und gewählten Säuleneigenschaften dringen die Moleküle unterschiedlich tief in die Gelmatrix ein. Kleineren und globulären Molekülen steht mehr Raum zur Diffusion zur Verfügung als größeren und ungeordneteren.

Daher erfahren kleinere Moleküle durch das tiefere Eindringen in die Gelmatrix eine Verzögerung und eluieren später von der Säule als größere. Der Elutionspuffer selbst hat selbst ebenfalls einen Einfluss auf die Trennung der Moleküle. Entscheidend ist hierbei das Löslichkeitsverhalten unterschiedlicher Moleküle bei der Salzkonzentration des Puffers. Die Ausschlußchromatographie ist daher eine beliebte Methode, um Proteine nach den ersten Aufreinigungsschritten von Verunreinigungen zu befreien. Die Auflösung ist abhängig von der Flußgeschwindigkeit und dem aufgetragenen Probenvolumen, wobei kleine Volumina vorzuziehen sind.

2.2.4.1.3.1 Präparative Ausschlußchromatographie zur weiteren Aufreinigung von Proteinen

Die HiPrep 26/60 Superdex200 Säule von Amersham Pharmacia Biotech eignet sich zur Trennung von Proteinen mit einer Molekülmasse von weniger als 200 kDa. Ihre Gelmatrix besteht aus Allyldextran, das kovalent zu N,N'-Methylenbisacrylamid verknüpft ist.

Nach Äquilibrierung der Säule mit 1,5fachem Säulenvolumen Elutionspuffer wird die Probe über einen 5ml-Loop injiziert. Die Proteinprobe wird von der Säule mit Puffer eluiert, 5 ml große Fraktionen werden aufgefangen und die Fraktionen anschließend im SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Elutionspuffer:

20mM	Tris/HCl pH 7.5
100mM	NaCl
2mM	β-Mercaptoethanol

2.2.4.1.3.2 Analytische Ausschlußchromatographie zur Untersuchung von Proteinkomplexen

Analytische Ausschlusschromatographiesäulen sind kleiner als präparative. Ihre Verwendung spart gegenüber präparativen Säulen viel Zeit, die Probevolumina, die aufgetragen werden können, sind aber wesentlich kleiner. Daher eignen sie sich nicht für die Aufreinigung rekombinanter Proteine. Sie können aber sehr gut zur Analyse stabiler Proteinkomplexe herangezogen werden, da während der Elution die Proteinkomplexe in der Regel intakt bleiben und ihr Elutionsverhalten ihre Komplexeigenschaften widerspiegeln.
Für die analytische Gelfiltration wurde eine 10/30-Superdex200 Säule von Amersham Pharmacia Biotech verwendet.
Zur Auftrennung des Impβ/Imp7-Heterodimers werden beide Proteine vor dem Säulenlauf in einem Verhältnis von 2:1, Impβ:Imp7 für eine halbe Stunde in 500 µl Gesamtvolumen bei 10° C inkubiert. Anschließend wird die Probe auf die zuvor mit Puffer gewaschene Säule aufgetragen und eluiert. 1 ml große Fraktionen werden gesammelt und im SDS Polyacrylamidgel analysiert.
Zusätzlich zu den Proteinkomplexen wird als Kalibrierung das Laufverhalten von Importin β und Importin 7 alleine untersucht.

Bindungspuffer/Elutionspuffer:

20 mM	Tris/HCl pH 7.5
100 mM	NaCl
2 mM	β-Mercaptoethanol

2.2.4.2 Co-Affinitätsaufreinigung von Impβ ohne Affinitätssequenz mit immobilisiertem $(His)_6$-Imp7

Für einen sog. „Pulldown Assay“ zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen werden Fusionsproteine oder Proteine mit Affinitätssequenz benutzt,

deren Fusionsanteil oder „Tag“ die Immobilisierung an Affinitätssäulen ermöglichen. Dies ermöglicht dann eine Co-Aufreinigung mit einem anderen Protein, das ein Bindungspartner für das immobilisierte ist. Auf diese Weise können beide Proteine in absoluter Stöchiometrie gewonnen werden, da sie als Komplex vorliegen.
In dieser Arbeit wurde eine solche Abwandlung des Pulldown Assays dazu benutzt, das Heterodimer aus Impβ und Imp7 aufzureinigen, um einen Überschuß eines der beiden Proteine im Eluat zu vermeiden. Dazu wurde eine HiTrapChelating Ni-NTA-Sepharose 5 ml benutzt.
Zunächst wird nach Äquilibrieren der Säule das zu immobilisierende Protein auf die Säule geladen. Anschließend werden mit 5 Säulenvolumina Waschpuffer unspezifische Bindungen gelöst. Dann wird das zweite Protein im Überschuß (2-3x) auf die Säule geladen, um den immobilisierten Bindungspartner vollständig abzusättigen. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wird mit 5 Säulenvolumina Waschpuffer gespült und schließlich im steigenden Imidazol-Gradienten eluiert. Das Eluat wird fraktioniert und per SDS-PAGE analysiert.
Wasch- und Elutionspuffer vgl. 2.2.3.1.1.1

2.2.4.3 Bindungsstudien mit dem Impβ/Imp7-Heterodimer und dem Linker-Histon $H1^0$

Das aus der Co-Affinitätsreinigung gewonnene Impβ/Imp7-Heterodimer (vgl. 2.2.3.2) wird durch zweimaliges Ankonzentrieren (vgl. 2.2.1.7) und jeweils darauf folgendes Verdünnen mit Gelfiltrationspuffer (vgl. 2.2.3.1.3) umgepuffert und anschließend äquimolar mit dem Histon $H1^0$, welches sich im gleichen Puffer befindet, 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der ternäre Komplex durch eine präparative Gelfiltration (vgl. 2.2.3.1.3.1) aufgereinigt und durch SDS-PAGE analysiert (vgl. 2.2.1.3.1).

2.2.5 Der *in vitro* Import Assay

Der von Adam und Gerace (1990) entwickelte *in vitro* Import Assay dient der Analyse von Kerntransportprozessen. Als *Rekonstitutionsexperimente* werden Untersuchungen verstanden, in denen aufgereinigte rekombinante Transportfaktoren einem bekannten Transportsubstrat hinzugefügt werden, um deren Aktivität zu testen.
In dieser Arbeit wurde der Assay durchgeführt, um die rekombinant hergestellten Kernimportrezeptoren Importin β, Importin7, sowie das Impβ/Imp7-Heterodimer auf ihre Funktionalität zu testen.

Für den *in vitro* Import Assay werden adhäsive Zellen der immortalen HeLa Tumorzellinie 24 Stunden vor der Durchführung des Import Assays auf Deckgläschen in 6er-Reservoir-Gewebekulturplatten ausgesät. Der Import Assay wird durchgeführt, wenn die Zellen eine Konfluidität von etwa 70% aufweisen.

Beim Import Assay werden die Zellmembranen durch Digitoninbehandlung permeabilisiert. Digitonin ist ein Steroid-Glycosid, das spezifisch 3β-Hydroxysterole bindet und daher die cholesterinreiche Plasmamembran selektiv permeabilisiert, während die Kerndoppelmembran funktionell nicht beeinträchtigt wird, da sie keine Cholesterin-Bausteine enthält. Die Digitoninpermeabilisierung erfolgt in Anwesenheit eines ATP-regenerierenden Systems. Dies hat zur Folge, dass so auch an den Kernmembranen der HeLa-Zellen gebundene, ansonsten aber lösliche, endogene Transportrezeptoren entfernt werden. Nun werden die Zellen mit einem physiologischen Transportpuffer gewaschen. Es entsteht dadurch ein riesiges, gemeinsames Cytosol aller HeLa-Zellen eines einzelnen Reservoirs, welches auch als „well" bezeichnet wird. Daher können rekombinante Faktoren und Substrate einfach mit den Zellen inkubiert und nach erfolgtem Import weggewaschen werden.

Nach einem erfolgreichen Import befinden sich die fluoreszenzmarkierten Transportsubtrate im Zellkern und können mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden.

Schritt 1: Permeabilisierung der Zellen

Es werden 2 x 10^5 Zellen 2 Tage beziehungsweise 5 x 10^5 Zellen 1 Tag vor Versuchsdurchführung auf sterilen Deckgläschen (∅10 mm) in 6er-Reservoir-Gewebekulturschalen ausgesät. Die Deckgläschen werden vor Versuchsbeginn in eisgekühlten Transportpuffer transferiert. Der Transportpuffer wird abgesaugt, kalter Permeabilisierungspuffer (PB, 4 ml/Well) ergänzt und nicht länger als 10 min inkubiert. Der PB wird abgesaugt und die Zellen dreimal mit kaltem Transportpuffer gewaschen (Waschzeiten: 1 min / 5 min / 10 min). Die Deckgläschen werden vorsichtig abgetropft. Anschließend werden sie in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dieser Behandlung sind die Zellen für den eigentlichen Transportvorgang vorbereitet.

Schritt 2: Transport-Reaktion

Nach dem Entfernen überschüssiger Flüssigkeit von den Deckgläschen wird der komplette Import-Mix (Die Ansätze haben vorzugsweise ein Volumen von 20 µl) auf die Zellen gegeben und in einer feuchten Kammer für 15 min bei RT inkubiert.

Schritt 3: Fixieren der Zellen und Detektion

Der Import-Mix wird von den Zellen abgesaugt. Nun werden die Zellen zweimal mit Transportpuffer gewaschen. Nach den Waschschritten werden die Zellen durch Inkubation mit 3%

Paraformaldehyd für 15 min bei 37°C fixiert. Nach zweimaligem Waschen können die Zellen eingebettet werden. Hierzu wird Fluroprep auf einen Objektträger getropft und ein Deckgläschen mit der bedeckten Seite nach unten blasenfrei in den Tropfen gelegt und versiegelt.
Die Detektion des Transportsubstrates erfolgte in dieser Arbeit an einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop, das mit einem FITC- und DAPI-Filter ausgestattet ist. FITC absorbiert bei 492 nm und emittiert Licht im grünen Spektralbereich mit einer Wellenlänge von 515 nm. Das Karyoplasma wird vom Cytoplasma durch Färbung mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI unterschieden.

Fluorochrom	λ_{Abs} **(nm)**	λ_{Em} **(nm)**
DAPI	344	450
FITC	494	526

Puffer und Lösungen:

- Digitonin: Stammlösung: 20 mg/ml in DMSO
- Permeabilisierungspuffer (PB): 40 µg/ml Digitonin in Transportpuffer
- Bovines Serumalbumin (BSA): 20 mg/ml
- ATP-regenerierendes System:
  - Kreatinphosphat: 10 mM
  - Kreatinkinase: 5 mg/ml 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 40 mM KCl, 1 mM DTT, 50% Glycerin, gelagert bei -70°C
  - GTP-Lösung.: 100 mM, pH 7.0, gelagert bei -70°C
  - ATP-Lösung: 100 mM, pH 7.0, gelagert bei -70°C
- HEPES/KOH-Puffer: 1 M, pH 7.3
- Saccharose 1,5 M
- 10 x Stammlösung.: 25.5 mg Kreatinphosphat
  50 µl ATP-Lösung
  50 µl GTP-Lösung
  166 µl Saccharose
  15 µl Kreatinkinase, auf 1 ml mit Wasser, Aliquots bei -70°C
- Reticulocytenlysat
- Transportsubstrat: 500 nM

HeLa-Zellen:

- Gewebekulturschalen mit 6 Wells (steril durch UV-Bestrahlung)
- Deckgläschen (10 mm Durchmesser) (steril durch UV-Bestrahlung)
- Paraformaldehyd 3% (w/v) in PBS
- Nagellack, Objektträger
- Transportpuffer 20 mM Hepes
  110 mM KAc,
  2 mM $Mg(OAc)_2$
  1 mM EGTA
  2 mM DTT, pH 7.4,
  1 µg/µl Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin

In den Rekonstitutionsexperimenten werden dem Versuchsansatz neben dem Transportsubstrat entweder exogenes Cytosol (Reticulocytenlysat) oder eine Kombination aus rekombinanten Transportfaktoren hinzugefügt. Die einzelnen Transportfaktoren sind wie folgt konzentriert:

Transportfaktoren: Importin β ohne „Tag“: 0.5 – 1,5 µM
Importin 7: 0.5 – 1,5 µM
Impβ/Imp7-Dimer: 0,5 – 1,5 µM
Transportsubstrat: 0.5 µM

Allen Transportansätzen wird ein Ran/NTF2- und ein Energiemix zugegeben:

Energiemix: Ran 3 µM
NTF2 0.4 µM

Alle Ansätze werden mit Transportpuffer auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht.

Die Bilder des Assays werden an einem Fluoreszenzmikroskop mit einer CCD-Kamera aufgenommen und am PC bearbeitet (Kontrast, Helligkeit).

2.2.6 Kristallisation von Proteinen

2.2.6.1 Kristallisationsansätze

Bei der Kristallisation eines Proteins wird mithilfe von Salzen, Puffern und Präzipitantien eine Proteinlösung in den übersättigten Zustand überführt.

In diesem metastabilen Zustand gibt es zwei Möglichkeiten, wie ein Protein sich verhalten kann:

1. Es fällt aus, die Konzentration an gelöstem Protein sinkt dadurch drastisch ab. Dieser Vorgang ist stark exergonisch, da so der höchste Grad an Entropie erreicht werden kann.
2. Das Protein bildet Kristallisationskeime aus, aus denen richtige Proteinkristalle wachsen können. Dieser Prozeß geschieht in der Regel deutlich langsamer als die Präzipitation und ist auch nicht so energetisch günstig, da nicht die maximale Entropie erreicht wird.

In der Kristallographie wird nach Bedingungen gesucht, die den zweiten Fall ermöglichen. Dazu werden zu Beginn sog. „Initial Screens“ durchgeführt, um erste Kristallisationsbedingungen für ein Protein zu finden. Bei den Initial Screens handelt es sich um eine Sammlung von Eingangsbedingungen, die relativ häufig zur Kristallisation verschiedener Proteine geführt haben. Das aufgereinigte Protein wird dabei zu Anfang meist in einer Konzentration von 10 mg/ml getestet.

Sobald Bedingungen ausgemacht sind, die für eine Kristallisation günstig sind, wird in einem Raster um die Bedingungen herum optimiert. Dabei können die Konzentrationen der enthaltenen Salze, Puffer und Präzipitantien variiert werden, es können aber auch Substitutionen getestet werden.

Für die Kristallisation im sog. sitzenden Tropfen werden 24er-Ansatz-Kristallisationsplatten verwendet, deren einzelne Kammern eine zentrale Säule mit darin liegender Vertiefung, dem sog. „well“, und ein darunter liegendes Reservoir besitzen. In das Reservoir wird eine Bedingung vorgelegt, die dann im Well mit dem Protein zu einem Tropfen vermischt wird. Es besteht also ein Konzentrationsgradient an Salzen und Präzipitantien zwischen Tropfen und Reservoir, da der Tropfen neben dem Protein nur 50 % der Salz- und Präzipitans-Konzentration des Reservoirs enthält.

Durch Diffusion des Wassers aus dem Tropfen in das Reservoir wird der Tropfen im Well nun langsam eingeengt und das enthaltene Protein ankonzentriert. Wird dabei der Punkt der Übersättigung überschritten. Es kann als Ausweg aus diesem metastabilen Zustand spontan eine Proteinkristallisationskeimung stattfinden.

Zunächst werden 500 µl der zu testenden Kristallisationsbedingung in das Reservoir pipettiert. Aus diesem wird nun 1 µl entnommen und in den Well überführt. Anschließend wird 1 µl der Proteinlösung in den Well pipettiert und gut gemischt. Schließlich wird der Well mit Klarsichtklebeband verschlossen, um einem Austrocknen vorzubeugen. Der Tropfen wird in der ersten Woche täglich kontrolliert. Danach wird einmal pro Woche bis einschließlich vier Wochen nach dem Pipettieren der Bedingung kontrolliert. Später wird der Tropfen einmal im Monat überprüft.

Bilder der verschiedenen Tropfen werden mit einer Digitalkamera, die auf ein Binokular aufgesetzt wird, aufgenommen und am PC bearbeitet (Kontrast, Helligkeit, Gamma).

2.2.6.2 „Macro-Seeding“ zur Verbesserung des Kristallwachstums

Wenn sich erste, kleine Kristalle entwickelt haben, die aber wegen einer zwischenzeitlich zu geringen Proteinkonzentration im Tropfen nicht mehr weiterwachsen, so kann mittels „Macro-Seeding“ das Kristallwachstum fortgesetzt werden.
Hierzu werden Kristallisationskeime aus dem ersten Tropfen mithilfe eines Katzenschnurrhaares in neue Tropfen überführt, „gesät“. Deren Inhalte sind analog zum ersten, mit einer Ausnahme: Entweder die Präzipitans- oder die Proteinkonzentration müssen in diesen Tropfen gegenüber dem ersten verringert sein, da es sonst zu einer sofortigen Präzipitation des Proteins in den neuen Tropfen kommen kann.

2.2.6.3 „Micro-Seeding“ zur Verbesserung der Kristallordnung

Wenn sich Kristalle formiert haben, die ungünstige innere Ordnung haben, d.h. daß sie z. B. von unregelmäßiger Gestalt und geringer Auflösung im Röntgendiffraktometer sind, so können Bruchstücke dieser Kristalle in verdünnten Lösungen (z. B. 1:200 in einer frischen Proteinlösung) Kristallisationskeime für Kristalle höherer Ordnung sein. Beim „Micro-Seeding“ werden die Kristallisationskeime wie beim Macro-Seeding mit Katzenschnurrhaaren in neue Tropfen überführt. Auch hier gilt, daß entweder Präzipitans- oder Proteinkonzentration verringert sein sollten.

2.2.6.4 Röntgenbeugungsexperimente

Für die Durchführung eines Röntgenbeugungsexperimentes mit einem Proteinkristall wird dieser in einem Röntgendiffraktometer mit Röntgenstrahlen beschossen, die durch die Elektronen im Kristallgitter abgelenkt werden. Da im Kristallgitter sich jede Struktur, die größer als die Einheitszelle ist, sich durch Translation oder Additionen dieser Einheitszelle erzeugen läßt, und dadurch eine unendliche Periodizität entsteht, werden die Röntgenstrahlen an theoretischen Ebenen durch den Kristall gebeugt. Das aus einem Röntgenbeugungsexperiment resultierende Beugungsmuster stellt daher viele einzelne Punkte dar, die durch eine reverse Fourier-Transformation die Raumkoordinaten der theoretischen Ebenen, genauer die Schnittstellen dieser Ebenen mit den drei Raumachsen, wiedergeben, an denen der Röntgenstrahl gebeugt wurde.

So kann aus einem Datensatz mit vielen solcher Röntgenbeugungsmuster eine sog. Elektronendichtekarte der Einheitszelle im Kristall erstellt werden. In dieses wird durch PC-Analysemethoden die Aminosäuresequenz des Proteins eingebaut, so daß schließlich eine dreidimensionale Struktur des untersuchten Proteins auf atomarer Ebene dargestellt werden kann.
Für die Durchführung eines Röntgenbeugungsexperiments wird der Proteinkristall mit einer kleinen Schlinge aus dem Kristallisationstropfen entnommen und vor den Strahlengangverschluss des Diffraktometers gespannt. Dabei wird der Kristall in einem Stickstoffgasstrahl gekühlt und anschließend der Röntgenstrahlung ausgesetzt. Dabei rotiert der Kristall dreidimensional um vorher definierte Gradzahlen, um so durch die Drehung der theoretischen Ebenen durch den Kristall ein Beugungsspektrum zu erhalten. Für Testzwecke, also um zu verifizieren, ob der Kristall aus Protein oder Salz besteht, wird oft um 5 Grad binnen einer Minute gedreht. Das Beugungsmuster wird über einen strahlungssensitiven Schirm detektiert und am PC ausgewertet.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in vier Abschnitte:
Im ersten Teil wird erläutert, wie eine Expressions- und Aufreinigungsstrategie für den Kernimportrezeptor Importin 7 aus *Xenopus laevis* etabliert wurde, um das Protein in ausreichender Reinheit für die Kristallisation zu gewinnen.
Im zweiten Teil wird gezeigt, wie die Expression und Aufreinigung für den Kernimportrezeptor Importin β ohne Affinitätssequenz etabliert wurde, und wie das Protein gemeinsam mit Imp7 mit N-terminaler His-Sequenz in der Co-Affinitätsaufreinigung gewonnen wurde.
Der dritte Teil stellt die Aktivitätstests beider Proteine dar und beleuchtet ihre Interaktion beim Import des Linker Histons H1. Hier wird zusätzlich die Aufreinigung des ternären Impβ/Imp7/H1-Komplexes erläutert.
Der vierte Teil behandelt schließlich die Kristallisationsversuche mit rekombinantem Imp7 sowohl allein als auch mit seinen Bindungspartnern Impβ und H1.

3.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Importin 7 aus *Xenopus laevis*

Der Kernimportrezeptor Imp7 steht in mehreren Gesichtspunkten im Mittelpunkt des Interesses: Einerseits ist er als Bindungspartner von Impβ beim H1-Import identifiziert worden, andererseits ist er auch eigenständiger Transportrezeptor in mehreren bislang untersuchten Importwegen. Die Gemeinsamkeit dieser Prozesse ist die basische Natur der Substrate. Auf welche Weise Imp7 aber seine Substrate binden kann und in welcher Weise es mit Impβ bei der kooperativen Bindung des Histons H1 interagiert, ist noch unklar. Röntgenkristallographische Untersuchungen sollen Licht ins Dunkel bringen und das Studium der Interaktionen und der beteiligten Domänen der Bindungspartner ermöglichen.
Für die Kristallisation von Imp7 ist eine zuverlässige Expressions- und Aufreinigungsmethode unerläßlich. Die Methodik muß so weit optimiert werden, daß die für die Kristallisation nötigen Ausbeutemengen erreicht werden, also mehrere Milligramm pro Aufreinigung.
Das für Imp7 codierende Gen war bereits in den Vektor pQE-9 kloniert worden und wurde von Prof. Dr. D. Doenecke zur Verfügung gestellt. Der Vektor wurde in XL1-Blue vermehrt und durch eine Maxi-Präparation isoliert (vgl. 2.2.3.3.2).

Er bietet den Vorteil einer N-terminalen Sequenz aus sechs Histidinen, welche eine affinitätschromatographische Aufreinigung von Imp7 ermöglicht. Ein weiterer Vorteil der His-Sequenz besteht darin, daß es offensichtlich nicht notwendig ist, die Sequenz durch einen Proteaseverdau abzuschneiden, da auch andere Kernimportrezeptoren der Impβ-Familie, insbesondere Fragmente von Impβ selbst, mit His-Sequenz kristallisiert wurden (Cingolani et al., 1999, Vetter et al., 1999 und Bayliss et al., 2000, vgl. 1.3.1).

3.1.1 Überexpression von Importin 7 in *E. coli*

Für die Expression von Imp7 in *E. coli* wurde zunächst ein geeigneter Expressionsstamm gesucht. Dazu wurden mehrere Stämme (HB101, TG 1, HMS 174 LysS, BL21 (DE3) LysE, XL1-Blue, M15, DH5α) mit dem Vektor transformiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen (vgl. 2.2.3.3). Die Stämme XL1-Blue, HB101 und DH5α sind eigentlich für die Plasmidvermehrung und nicht für die Proteinexpression bestimmt, wurden aber zur Sicherheit dennoch getestet. Von den Platten wurden kleine Kulturen in 10 ml LB-Medium (vgl. 2.2.3.4.1) angeimpft und für jeden Stamm im kleinen Maßstab mehrere Expressionsbedingungen (Temperatur und Induktionszeit) getestet. Induziert wurde mit 0,5 mM IPTG, sobald die Kulturen eine von 0,6 erreicht hatten. Die Induktionsdauer betrug 3-7 Stunden, die Kulturen hatten in dieser Zeit i. d. R. eine OD_{600} von 1,5 (nach 3 h) bis 2,7 (nach 7 h) erreicht. Es wurden jeweils Zellsuspensionsproben unmittelbar vor der Induktion und vor der Ernte genommen und per SDS-PAGE auf eine Expression von Imp7 untersucht (vgl. 2.2.1.3.1). Die Suche nach dem richtigen Stamm gestaltete sich schwierig, da die meisten Stämme Vollängen-Imp7 entweder gar nicht oder nur in sehr geringen löslichen Mengen produzierten. Die Bildung von inclusion bodies war ein großes Problem. Es stellte sich aber heraus, daß der Stamm *E. coli* SG13009 in der Lage war, Imp7 in größeren Mengen löslich zu exprimieren. Ein Vergleich der Expressionsniveaus einiger ausgewählter Stämme mittels SDS-PAGE ist in Abb. 10 dargestellt.

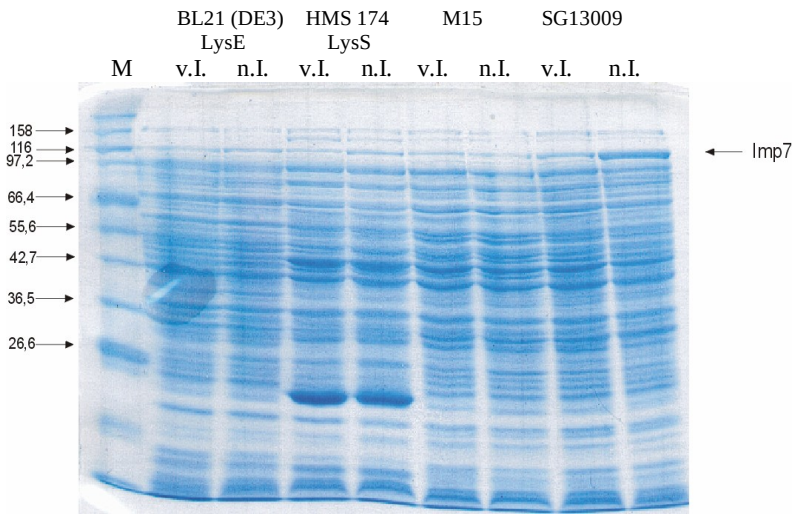


Abb. 10: Expressionsniveaus von Imp7 in verschiedenen *E. coli*-Stämmen bei 29° C. Lediglich *E. coli* SG13009 zeigt eine signifikante Expression von Imp7, allerdings ist in der zugehörigen Spur „vor Induktion" eine schwache Basisexpression zu erkennen. M = BR-Marker, v.I. = vor Induktion, n.I. = nach Induktion.

Die Induktionstemperatur wurde auf 15° C gesenkt, da ein Vergleich der Expressionslevels bei 29° C und 17° C zeigte, daß bei niedrigeren Temperaturen die Ausbeute an synthetisiertem Protein zusätzlich um den Faktor 4-5 gesteigert werden kann (Abb. 11). Viel wichtiger ist zudem die erhöhte Löslichkeit, da bei gemäßigteren Induktionsbedingungen die Formierung von inclusion bodies deutlich zurückging, wie Untersuchungen der Expressionskultur unter dem Mikroskop ergaben (Die Daten werden nicht dargestellt).

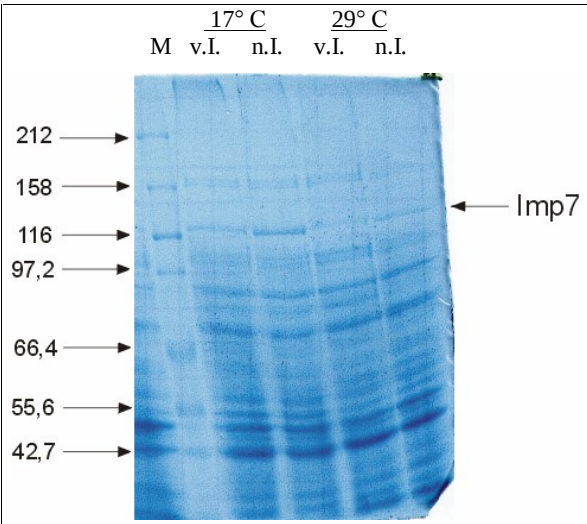


Abb. 11: Optimierung der Induktionstemperatur. SDS-PAGE. Das Expressionsniveau in SG13009 konnte bei niedrigeren Induktionstemperaturen deutlich gesteigert werden. Die Spuren „nach Induktion" bei 17° und 29° C im Vergleich belegen dies. M = BR-Marker, v.I. = vor Induktion, n. I. = nach Induktion.

Durch Zugabe 2 % (w/v) Glucose konnte die Basisexpression durch Promotorrepression gesenkt und durch den Zusatz von K_2HPO_4 und besonders 2% Ethanol abs. die Löslichkeit von Imp7 weiter gesteigert werden. Die Induktionszeit wurde anhand der Ausbeute nach der Affinitätschromatographie (vgl. 3.1.2) bestimmt (Tab. 3).

Tab. 3: Ausbeute an Imp7 nach der Affinitätschromatographie in Abhängigkeit von der Induktionszeit.

Induktionszeit [h]	6	12	16	24
Ausbeute [mg/l LB-Kultur]	2	3,2	4	3,8

Um die Expressionskulturen bei einer höheren Zelldichte ernten zu können, wurde später von LB-Medium auf 2YT-Medium umgestellt (vgl. 2.2.3.2 und 2.2.3.4.2).

Zunächst wurde eine 10 ml-Vorkultur angeimpft (vgl. 2.2.3.4.1) und über Nacht bei 29° C unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde eine 400 ml-Vorkultur angeimpft, die im Schüttelinkubator bei 29° C bis zu einer OD_{600} von 2,4 wachsen gelassen wurde. Diese Vorkultur wurde schließlich mit 580 ml 4°-C-kalten LB-Mediums, 20 ml Ethanol abs. (also 2 % v/v) und 0,5 mM IPTG auf 1 l Gesamtvolumen induziert. Die Expressionsbedingungen sind zusammenfassend in Tab. 4 dargestellt.
Später wurde der Stamm SG13009 [pREP4] verwendet (vgl. 2.2.3.1), wodurch die Basisexpression nahezu auf Null gesenkt werden konnte.

Tab. 4: Expressionsbedingungen für Imp7.

Expressions-vektor	Stamm	erforderliche Antibiotika	Expressions-medium	Induktion	Induktionszeit und -temperatur
pQE-9-hexaHis-Imp7	*E. coli* SG13009 [pREP4]	100 mg/l Ampicillin 50 mg/l Kanamycin	2 YT, 20 mM K_2HPO_4, 2 % (w/v) Glucose	0,5 mM IPTG, 2 % (v/v) EtOH abs.	16 h bei 15° C

3.1.2 Subklonierung von Imp7 aus *Xenopus* in den Expressionsvektor pET-21a

Parallel zu den Expressionsstudien wurde eine Subklonierung des Gens für Imp7 vorgenommen. Dies sollte eine Expression mit einer anderen Affinitätssequenz als $(His)_6$ ermöglichen, damit Imp7 später selektiv mit $(His)_6$-Impβ gemeinsam aufgereinigt werden kann.

Das Gen für Imp7 wurde mit BamH I und Hind III, wie unter 2.2.2.1.2 angegeben, aus dem Vektor pQE-9 ausgeschnitten. Parallel wurde pET-21a mit den gleichen Restriktionsendonucleasen verdaut. Der Restriktionsverdau wurde auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 12) und die Banden mit verdautem Insert und verdautem Zielvektor ausgeschnitten (vgl. 2.2.1.3.2, 2.2.1.4.2 und 2.2.1.5).

Nun wurde das Insert in pET-21a durch eine Ligation einkloniert (vgl. 2.2.2.1.3). Der fertige Vektor pET-21a-Imp7 wurde in XL1-Blue transformiert und die transformierten Zellen auf einer Selektionsplatte ausgestrichen. Die erfolgreiche Subklonierung wurde durch eine Kolonie-PCR verifiziert (vgl. 2.2.2.1.1, Abb. 13).

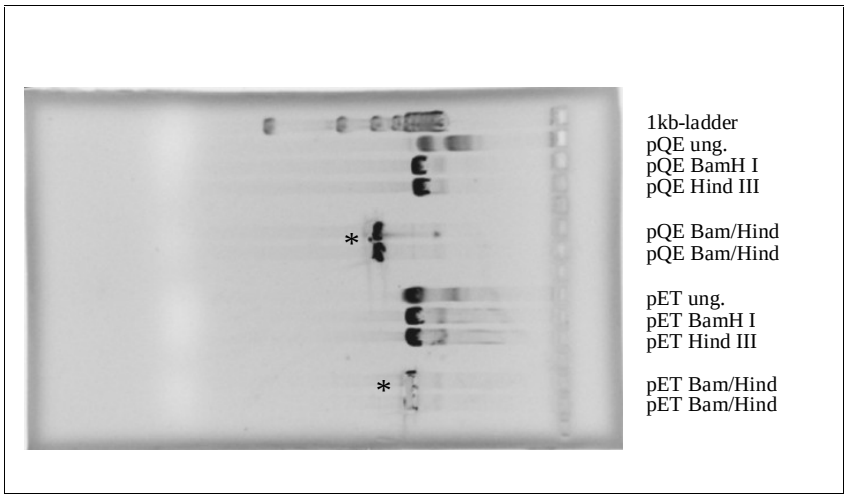


Abb. 12: Restriktionsverdau von pQE-9-Imp7 und pET-21a. 1 %iges Agarosegel. Die oberen fünf Spuren zeigen den Verdau von pQE-9-Imp7, die unteren fünf den Verdau von pET-21a. Der Restriktionsverdau war bei beiden Vektoren erfolgreich. Das Insert (3,2 kbp) lief unterhalb des restlichen Vektors pQE-9 (3,4 kbp). Das Insert und der Zielvektor (5,4 kbp) wurden aus dem Gel ausgeschnitten. Ihre ehemaligen Positionen sind an den Schatten der Bam/Hind-Spuren zu erkennen und durch Sterne gekennzeichnet. pQE = pQE-9-Imp7, pET = pET-21a, ung. = ungeschnitten (Negativkontrolle).

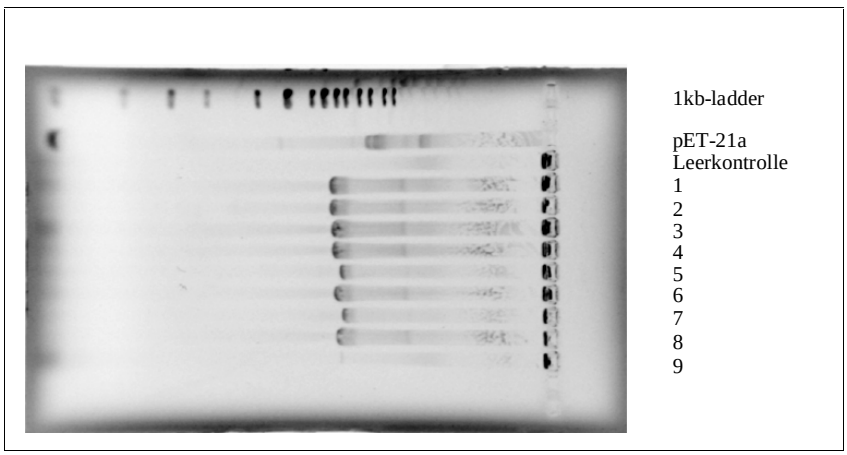


Abb. 13: Kolonie-Screen. 1 %iges Agarosegel. Das Gen für Imp7 wurde in einer Kolonie-PCR durch Vektorprimer für pET-21a amplifiziert. Das Insert ist bei den Kolonien 1-8 erfolgreich in pET-21a ligiert worden. In den Spuren ist es jeweils deutlich bei etwa 3,2 kbp zu erkennen. pET-21a = Leervektor als Positivkontrolle für die Vektorprimer, die Nummern entsprechen den getesteten Kolonien auf der Selektionsplatte nach der Transformation.

Der neue Vektor pET-21a-Imp7 wurde in einer Midi-Prep (vgl. 2.2.2.3.1) vermehrt und isoliert. Anschließend wurde das inserierte Gen mithilfe der Vektorprimer ansequenziert (vgl. 2.2.4.2). Der korrekte Einbau, die Position des Gens im offenen Leserahmen und die Richtigkeit der ersten und letzten 700 Aminosäuren konnte so bestätigt werden.
Da die Co-Aufreinigung von Imp7 und Impβ schließlich etabliert werden konnte (vgl. 3.2.3), wurde der Vektor pET-21a-Imp7 jedoch nicht für eine weitere Subklonierung in einen Vektor mit anderer Affinitätssequenz verwendet.

3.1.3 Aufreinigung von N-$(His)_6$-Importin 7

3.1.3.1 Zellernte und Aufschluß

Bei Ernte und Aufschluß wurde, wie unter 2.2.3.5 angegeben, verfahren. Die Änderungen, die sich im Laufe der Arbeit ergaben, sind im Folgenden angeführt.

Lysispuffer:

50 mM	Tris/HCl pH 8,0
300 mM	NaCl
4 % (v/v)	Glycerin
2 mM	β-Mercaptoethanol

Der Überstand des Zellaufschlusses nach der Ultrazentrifugation wurde unmittelbar vor dem Beladen der Ni-NTA-Sepharose-Säule durch einen Aufsatzfilter für Spritzen mit einer Porengröße von 200 nm Durchmesser filtriert.

3.1.3.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Importin 7

Für die Affinitätschromatographie wurde eine HiTrapChelating Ni-NTA-Sepharose-5ml-Säule von Amersham benutzt, die Bedingungen entsprachen den unter 2.2.3.1.1.1 aufgeführten.
Abb. 14 zeigt ein typisches Elutionsprofil von Imp7 in der Affinitätschromatographie.
Auffällig ist das Auftreten zweier Peaks, die beide Imp7 enthalten. Nur der erste aber stellt aktives Protein dar, da der zweite Peak überwiegend dimerisiertes Protein enthält, wie durch Gelfiltration nachgewiesen werden konnte (nicht dargestellt). Das dimerisierte Protein, das zudem möglicherweise falsch gefaltet ist, erwies sich im Import Assay (vgl. 2.2.5 und 3.3) als nur sehr beschränkt aktiv (W. Albig, 2004, persönliche Mitteilung).

Dieser zweite Peak trat nicht in allen Aufreinigungen auf und wird daher als Artefakt betrachtet. In anderen Aufreinigungen eluierte dimerisiertes Imp7 gemeinsam mit dem Monomer. Die Präsenz von Imp7 in den Fraktionen des Eluats wurde mittels SDS-PAGE verifiziert (Abb. 15).

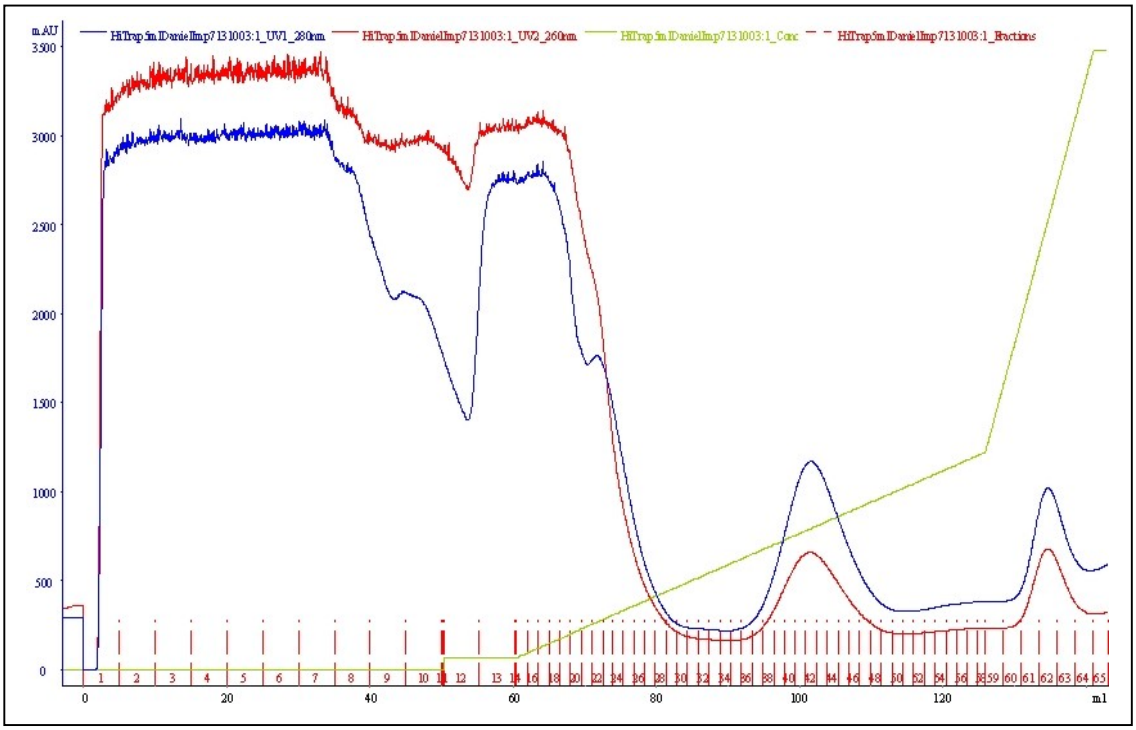


Abb. 14: Chromatogramm der Affinitätschromatographie von Imp7 über eine Ni-NTA-Sepharose Säule. Bei der Elution von Imp7 treten zwei Peaks auf: Die erste Fraktion von Imp7 eluiert zwischen 72 und 100 mM Imidazol, die zweite zwischen 200 und 250mM. Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Rot: UV-Absorption bei 260 nm. Grün: Elutionsgradient, 100 % = 400 mM Imidazol.

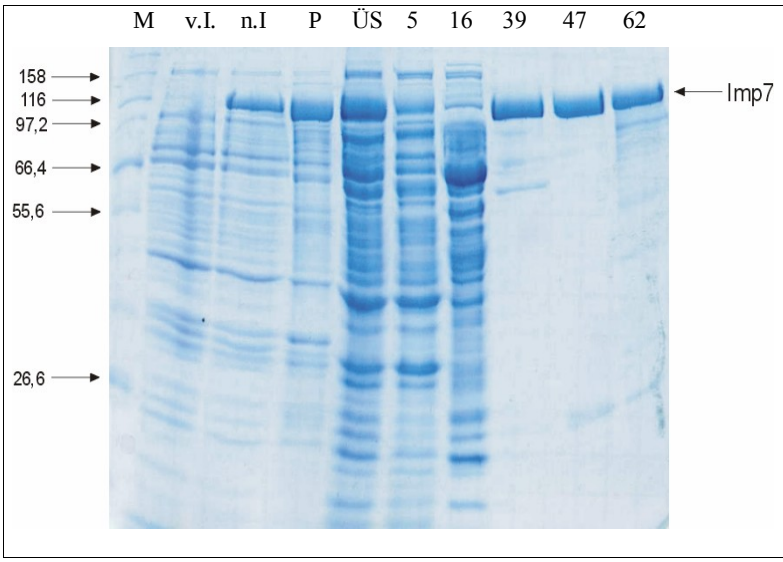


Abb. 15: SDS-PAGE der Affinitätschromatographie von Imp7 über eine Ni-NTA-Sepharose-Säule. M = BR-Marker, v.I. = vor Induktion, n.I. = nach Induktion, P = Pellet des Zellaufschlusses nach Ultrazentrifugation, ÜS = Überstand des Zellaufschlusses nach Ultrazentrifugation, die Zahlen stellen die Fraktionen des Eluats dar (vgl. Abb. 14).

Die Fraktionen, welche monomeres Imp7 enthielten, wurden vereinigt und auf ein Volumen von 5 ml ankonzentriert (vgl. 2.2.1.7). Für die folgenden Kristallisationsversuche vgl. 3.4.

3.1.3.3 Gelfiltration des Pools aus der Affinitätschromatographie

Für die präparative, ausschlußchromatographische Aufreinigung des Imp7-Pools aus der Affinitätschromatographie wurde wie unter 2.2.3.1.3.1 verfahren.

Das Chromatogramm der Gelfiltration ist in Abb. 16 dargestellt. Der niedrige Peak um Fraktion 38 vor dem Hauptpeak der Fraktionen 41-47 stellt wahrscheinlich dimerisiertes Imp7 dar, da das Elutionsvolumen dieses Peaks in etwa einem Molekulargewicht von 200-250 kDa entspricht. Dies wurde durch das vergleichbare Elutionsvolumen des Impβ/Imp7-Heterodimers (mit einem Molekulargewicht von 217 kDa) bestätigt (vgl. Abb. 24). Dieser Peak war bei der gelchromatographischen Untersuchung des zweiten Peaks aus der Affinitätschromatographie (vgl. Abb. 14) der prominente (visualisiert durch SDS-PAGE ohne vorheriges Aufkochen der Proben, nicht dargestellt).

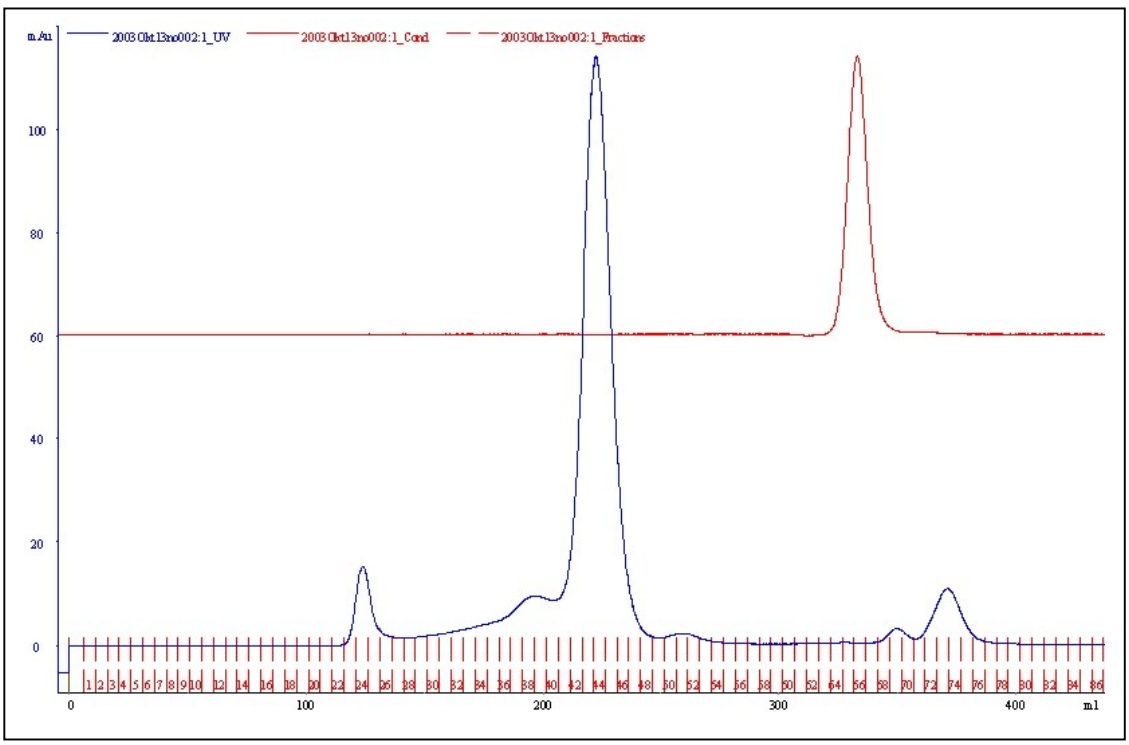


Abb. 16: Elutionsprofil der Gelchromatographie von Imp7 über eine Superdex-200-Säule. Der Peak der Fraktionen 41-47 stellt als Monomer vorliegendes Imp7 dar. Der kleine Peak um Fraktion 38 ist vermutlich dimerisiertes Imp7, welches daher früher eluiert. Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Rot: Leitfähigkeit.

Das Eluat wurde durch SDS-PAGE (Abb. 17) untersucht. Die Fraktionen, welche Imp7 enthielten, wurden vereinigt und auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml (~83 µM) ankonzentriert (Proteinbestimmung nach Bearden, 1978, vgl.2.2.1.1 und 2.2.1.2).

Geringe Verunreinigungen bestanden aus Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 80-110 kDa, sowie einem Protein von 60 kDa, das wahrscheinlich HSP60 ist (Heat shock protein 60).

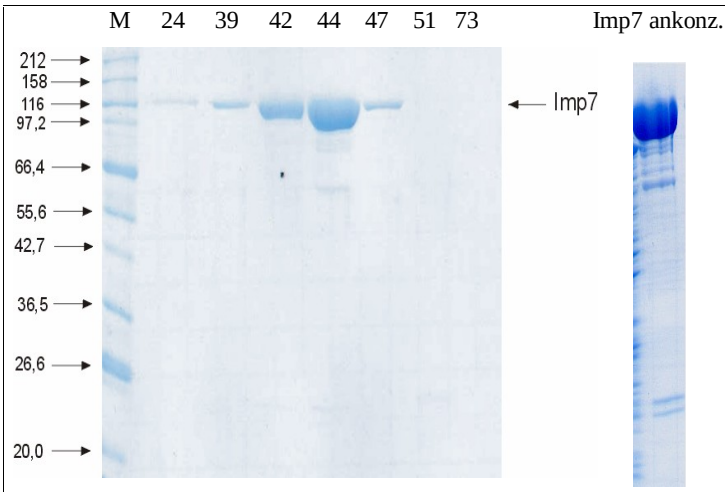


Abb. 17: SDS-PAGE der Gelchromatographie von Imp7 über eine S200-Gelfiltrationssäule.
Die Fraktionen 42-47 zeigen eine hohe Reinheit von Imp7. Leichte Verunreinigungen bestehen aus Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 80 und 110 kDa, sowie einer geringen Menge eines Proteins von etwa 60 kDa, möglicherweise HSP60. Fraktion 39 enthält ebenfalls Imp7, das vermutlich dimerisiert ist (vgl. Abb. 16). Die rechte Spur zeigt das ankonzentrierte Endprodukt, es wurden 8 µg aufgetragen. Der Standard ist der gleiche wie im linken Gel.
M = BR-Marker, die Zahlen repräsentieren die entsprechenden Fraktionen des Eluats (vgl. Abb.16).

Die Ausbeute an Imp7 nach der Aufreinigung schwankte zwischen 3 und 9 mg aus einem Liter 2YT-Kultur und betrug im Durchschnitt etwa 4,5 mg/l Kultur. Die durchschnittlichen Proteinausbeuten nach den einzelnen Aufreinigungsschritten zeigt Tab. 5.

Tab. 5: Zusammenfassung der Proteinausbeuten nach den jeweiligen Aufreinigungsschritten.

Aufreinigungs-schritt	Affinitäts-chromatographie	Ankon-zentrieren	Gelfiltration	Ankon-zentrieren
durchschnittliche Proteinmenge [mg/l 2YT-Kultur]	7,5	6,8	5	**4,5**

Parallel wurde die Expression und Aufreinigung nach gleichem Schema, allerdings mit geringerer IPTG-Konzentration (100 µM) für Imp7 im Vektor pQE-80Ndecahis durchgeführt. Der Vektor mit dem Gen für Imp7 wurde von Prof. Dr. Dirk Görlich zur Verfügung gestellt. Imp7 wird in diesem Vektor mit zehn N-teminalen Histidinen exprimiert. Daher eluiert es später von der Ni-NTA-Sepharose bei etwa 200 mM Imidazol (Daten werden nicht gezeigt). Die Aufreinigungsergebnisse waren sowohl in Bezug auf die Ausbeute als auch auf die Reinheit mit pQE-9 vergleichbar, so daß für die Kristallisation weiterhin der Vektor pQE-9 verwendet wurde.

3.2 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Importin β aus *Homo sapiens* ohne Affinitäts-Sequenz

Der Kernimportrezeptor Impβ ist der Namenspate der Impβ-Proteinfamilie (vgl. 1.2.3 und 1.3.1). Humanes Impβ besitzt ein Molekulargewicht von etwa 97 kDa, und ist 876 Aminosäuren lang. Da humanes Impβ nicht nur als Bindungspartner von humanem, sondern auch von *Xenopus*-Imp7 bekannt ist, sollte neben der Expression und Aufreinigung von Imp7 auch eine Strategie zur Gewinnung von Impβ ohne Affinitätssequenz etabliert werden, um so eine Co-Aufreinigung mit Imp7 in stöchiometrischem Verhältnis zu ermöglichen. Dies könnte die Wahrscheinlichkeit der Kristallisation von Imp7 erhöhen, da dieses durch Substratbindung vermutlich stabilisiert wird.

3.2.1 Überexpression von Importin β in *E. coli*

Impβ war bereits in den Vektor pQE60 kloniert worden. Der normalerweise in diesem Vektor enthaltene N-terminale His-Tag war zuvor entfernt worden. Der Vektor wurde von Prof. Dr. D. Görlich zur Verfügung gestellt. Er wurde in XL1-Blue vermehrt und durch eine Maxi-Präparation isoliert (vgl. 2.2.3.3.2).

Da bereits bekannt war, daß der Stamm *E. coli* M15 Impβ mit His-Affinitätssequenz effektiv exprimieren kann, wurden für die Expressionstests die nah miteinander verwandten Stämme M15 und SG13009 [pREP4] verwendet. In beiden Stämmen wurde Impβ bei 16° C ausreichend stark exprimiert (vgl. Abb. 18). Dabei zeigt sich, daß das apparente Molekulargewicht des Proteins im SDS-Gel geringer als 97 kDa zu sein scheint. Dies deckt sich mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (A. Strasser, 2003, persönliche Mitteilung). Es wurde der Stamm SG13009 [pREP4] ausgewählt, da hier die Basisexpression schwächer als in M15 war.

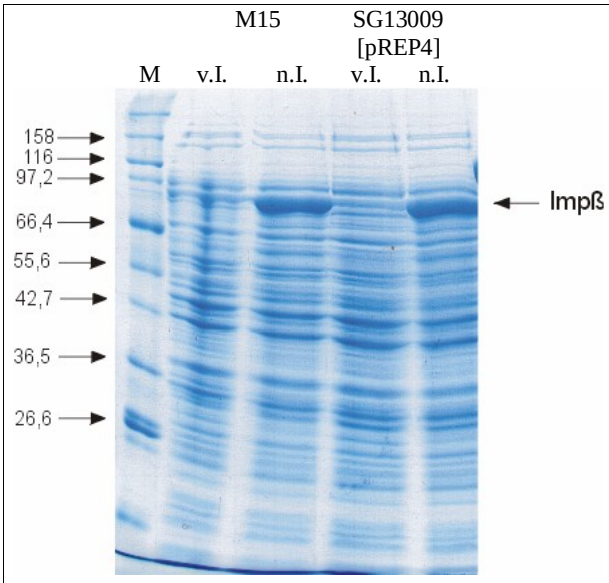


Abb. 18: Expressionstests von Impβ bei 16° C. SDS-PAGE. Impβ hat gemäß seinem Laufverhalten ein geringeres apparentes Molekulargewicht als 97 kDa. Sowohl M15 als auch SG13009 [pREP4] zeigen eine gute Expression von Impβ. Es wurden 2 % Glucose in die Vorkultur gegeben.
M = BR-Marker, v.I. = vor Induktion, n.I. = nach Induktion.

Durch Zugabe von 2 % Glucose konnte die Ausbeute gesteigert werden (vgl. 2.2.3.4.2). Auch hier erhöhte die Zugabe von Ethanol die Löslichkeit, der Zusatz von K_2HPO_4 hatte aber keinen weiteren Einfluß.

Die Induktionszeit wurde anhand der Ausbeuten nach ersten Tests der Anionenaustauschchromatographie (vgl. 3.2.2) optimiert und liegt idealerweise bei 18-20 Stunden (Tab. 6).

Tab. 6: Ausbeute an Impβ nach der Anionenaustauschchromatographie in Abhängigkeit von der Induktionszeit.

Induktionszeit [h]	3	7	18	22
Ausbeute [mg/l LB-Kultur]	8	12	17	18

Um höhere Zelldichten bei der Ernte zu erreichen, wurde bei der Expression später 2YT-Medium verwendet (vgl. 2.2.3).

Für die Überexpression von Impβ in SG13009 [pREP4] wurde zuerst eine 10-ml-Vorkultur in 2YT-Medium angeimpft (vgl. 2.2.3.2 und 2.2.3.4.1). Die Vorkultur inkubierte unter Schütteln bei 29° C über Nacht und wurde dann 1:50 mit frischem 2YT-Medium und 2 % Glucose auf ein Volumen von 500 ml verdünnt. Diese Vorkultur inkubierte bei 29° C bis zu einer OD_{600} von 1,8 und wurde dann mit 480 ml eiskalten 2YT-Mediums, 20 ml Ethanol abs. und 0,3 mM IPTG induziert. Die Induktionszeit betrug 18 Stunden bei 16° C. Die Expressionsbedingungen sind zusammenfassend in Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: Expressionsbedingungen für Impβ.

Expressions-vektor	Stamm	erforderliche Antibiotika	Expressions-medium	Induktion	Induktionszeit und -temperatur
pQE-60-Impβ-no-tag	*E. coli* SG13009 [pREP4]	100 mg/l Ampicillin 50 mg/l Kanamycin	2 YT, 2 % (w/v) Glucose	0,3 mM IPTG, 2 % (v/v) EtOH abs.	18 h bei 16° C

3.2.2 Aufreinigung von Importin β

3.2.2.1 Zellernte und –aufschluß

Bei Ernte und Aufschluß wurde wie unter 2.2.2.5 angegeben verfahren. Der Überstand des Zellysats nach der Ultrazentrifugation wurde unmittelbar vor dem Beladen der DEAE-Sepharose-Säule durch einen Aufsatzfilter für Spritzen mit einer Porengröße von 200 nm Durchmesser filtriert. Der pH-Wert des Lysis-/Startpuffers wurde durch Bindungsstudien an DEAE-Sepharose bei verschiedenen pH-Werten bestimmt.
Erwartungsgemäß lag der ideale pH-Wert für die Anionenaustauschchromatographie etwa eine pH-Einheit über dem theoretischen (berechneten) pI von Impβ (pI = 4,9), nämlich bei 6,2 (vgl. 3.2.2.2).

Lysispuffer:

20 mM BisTris/HCl pH 6,2
100 mM NaCl
2 mM β-Mercaptoethanol

3.2.2.2 Anionenaustauschchromatographische Aufreinigung von Impβ

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde mit einer DEAE-Sepharose-FF-Säule nach den Angaben in 2.2.4.1.2.1 vorgegangen. Es wurden drei verschiedene pH-Werte in den Puffern getestet:

20mM L-Histidin/HCl pH 5,7	20mM BisTris/HCl pH 6,2	20mM BisTrisPropan/HCl pH 7,0
100 mM NaCl	100 mM NaCl	100 mM NaCl
2 mM β-Mercaptoethanol	2 mM β-Mercaptoethanol	2 mM β-Mercaptoethanol

Lediglich bei Verwendung des BisTris-haltigen Puffers mit pH 6,2 band Impβ einerseits so fest, daß es nicht im Durchfluss von der Säule gewaschen wurde, wie bei Verwendung von L-Histidin pH 5,7 (nicht dargestellt) und andererseits so leicht, daß es im Gradienten von der Säule eluiert werden konnte. Bei Verwendung von BisTrisPropan pH 7,0 war dies nicht mehr gegeben (nicht dargestellt). Das Elutionsprofil ist in Abb. 19 dargestellt.

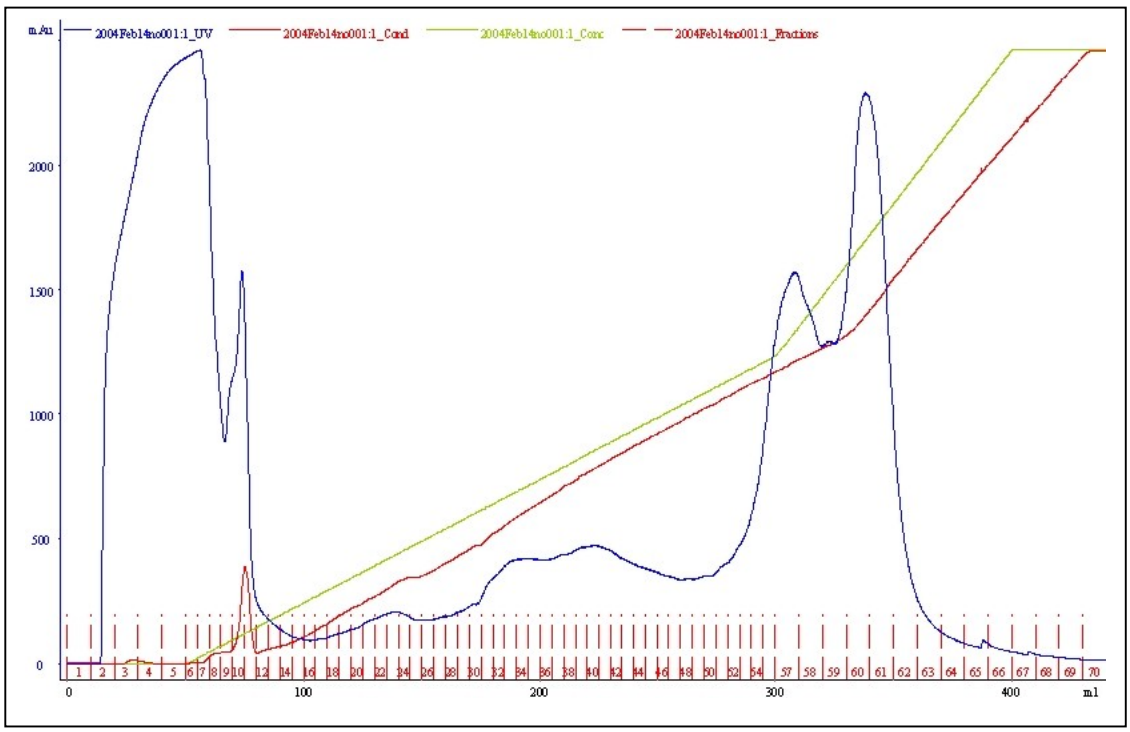


Abb. 19: Elutionsprofil von Impβ in der Anionenaustauschchromatographie über eine DEAE-Sepharose-Säule. Die Fraktionen 31-47 enthalten Impβ in großen Mengen. Bedingt durch die begrenzte Auflösungskapazität der DEAE-Sepharose ist der Peak sehr langgezogen. Auffällig ist das Auftreten zweier „Höcker" im Impβ-Peak, die aber nicht von Impβ herrühren, sondern von anderen Proteinen, die Verunreinigungen darstellen (vgl. Abb. 20). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Rot: relative Leitfähigkeit. Grün: Elutionsgradient.

Die Fraktionen des Eluats wurden durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 20), die Impβ-enthaltenden Fraktionen vereinigt und auf ein Volumen von 10 ml ankonzentriert (vgl. 2.2.1.7), da die Proteinkonzentration für ein kleineres Volumen zu groß war (vgl. Tab. 8). Daher mussten für einen DEAE-Pool zwei Gelfiltrationen durchgeführt werden, da sonst das Probevolumen, etwa 10 ml bei einer Proteinkonzentration von 13 mg/ml, für eine Gelfiltration zu groß geworden wäre.

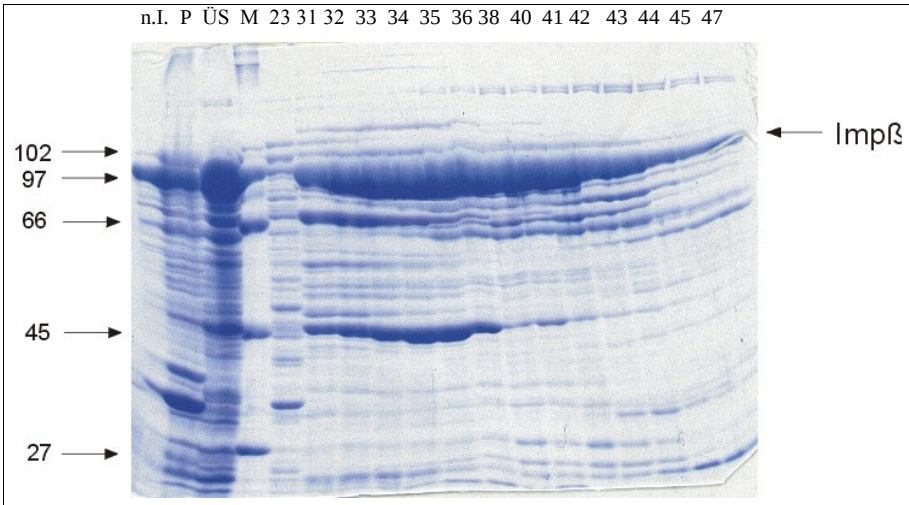


Abb. 20: SDS-PAGE der Fraktionen des Eluats der Anionenaustauschchroma-tographie. Der Peak der Fraktionen 31-47 wird hauptsächlich von Impβ verursacht. Die bei der Elution aufgetretene Zweiteilung des Peaks ergibt sich aus der Anwesenheit eines etwa 45 kDa und eines etwa 70 kDa schweren Proteins im ersten Teilpeak und mehrerer weiterer Proteine zwischen 60 und 90 kDa im zweiten Teilpeak. M = Marker, n.I. = nach Induktion, P = Pellet des Zellysats, ÜS = Überstand des Zellysats, die Nummern repräsentieren die entsprechenden Fraktionen des Eluates (vgl. Abb. 19).

3.2.2.3 Ausschlußchromatographische Aufreinigung des Pools

Als nächster und letzter Aufreinigungsschritt wurde eine präparative Gelfiltration mit einer Superdex-200-Säule durchgeführt, wie unter 2.2.4.1.3.1 beschrieben, durchgeführt, da die Reinheit von Impβ für den Pulldown Assay mit Imp7 völlig ausreichend war und dieser schließlich eine hochspezifische Affinitätschromatographie für Impβ darstellt.

Das Chromatogramm der Gelfiltration wird in Abb. 21 dargestellt.

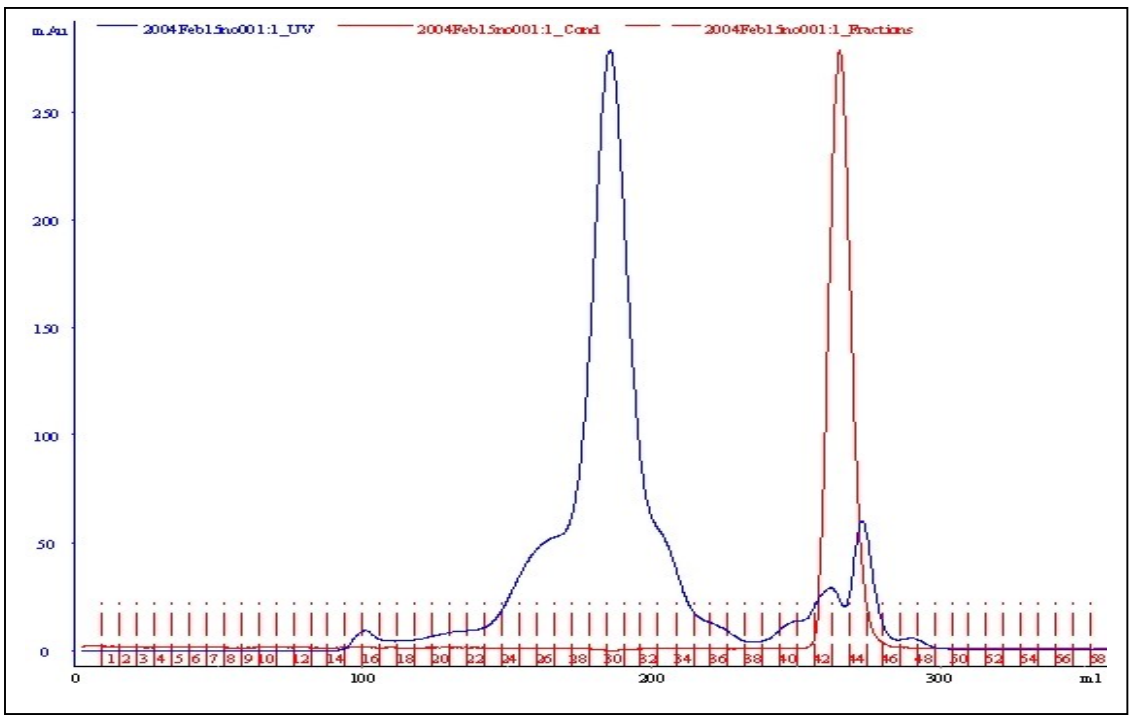


Abb. 21: Elutionsprofil der Gelfiltration von Impβ über eine Superdex-200-Säule. Die Fraktionen 23-34 enthalten alle Impβ, jedoch liegt es nur in den Fraktionen 28-31 als reines Monomer vor. Die früheren Fraktionen (23-27) enthalten dimerisiertes Impβ, die späteren (32-34) kürzere Fragmente, möglicherweise Abbauprodukte. Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Rot: Leitfähigkeit.

Die einzelnen Fraktionen des Eluats wurden durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 22).

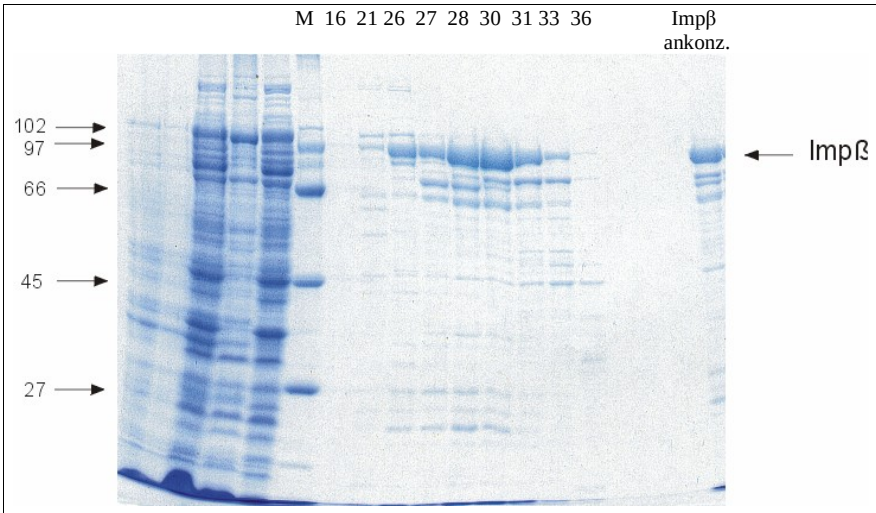


Abb. 22: SDS-PAGE der Fraktionen des Gelfiltrationseluates. Die Fraktionen des Hauptpeaks (28-31) enthalten hauptsächlich Impβ neben kleineren Verunreinigungen. Die Spur ganz rechts zeigt das ankonzentrierte Endprodukt, es wurde hier 1 µg Protein aufgetragen. Die Verunreinigungen wurden anhand dieser Spur auf 20 % geschätzt. M = Marker, Nummern repräsentieren die entsprechenden Fraktionen der Gilfiltration, Impβ ankonz. = Impβ-Pool ankonzentriert.

Impβ zeigt eine Tendenz, zu dimerisieren (A. Dickmanns, mündl. Mitteilung, 2003). Die Fraktionen, welche das Impβ-Monomer enthielten, wurden vereinigt und auf 10 mg/ml (~100 µM) ankonzentriert (vgl. 2.2.1.2).

Wie Abb. 19 zu entnehmen ist, treten einige Verunreinigungen durch Fremdprotein auf, deren Menge auf etwa 20 % der Gesamtproteinmenge geschätzt wurde. Dies ist in die Ausbeuteberechnung (Tab. 8, vorletzte und letzte Spalte) eingeflossen. Die Endausbeute an ungetaggtem Impβ betrug im Durchschnitt 80 mg aus einem Liter 2YT-Kultur.

Tab. 8: Zusammenfassung der Proteinausbeuten nach den jeweiligen Aufreinigungsschritten.

Aufreinigungs-schritt	Anionenaustausch-chromatographie	Ankon-zentrieren	Gelfiltration	Anko-zentrieren
durchschnittliche Proteinmenge [mg/l 2YT-Kultur]	140	130	85	**80**

3.2.3 Co-Aufreinigung des Importin-β/Importin-7-Heterodimers

Die Co-Aufreinigung des Impβ/Imp7-Heterodimers diente einerseits einer ersten Bestätigung der richtigen räumlichen Konformation von Impβ und Imp7, andererseits sollte auf diese Weise sichergestellt werden, daß das Heterodimer in der für die Kristallisation erforderlichen Reinheit vorliegt.

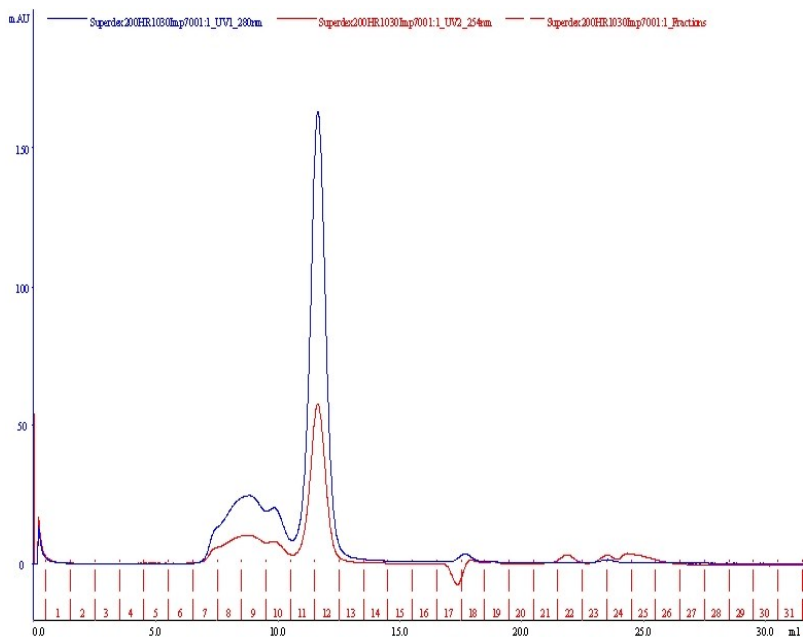
3.2.3.1 Bindungsstudien des Impβ/Imp7-Heterodimers

Die Bildung des stabilen Komplexes aus Impβ und Imp7 wurde durch eine analytische Gelfiltration getestet. Hierbei wurde, wie in 2.2.4.1.3.2 angegeben, verfahren.

Aufgereinigtes $(His)_6$-Imp7 (vgl. 3.1.3) und aufgereinigtes $(His)_6$-Impβ, welches von Anja Strasser (Göttingen) zur Verfügung gestellt worden war, wurden gemeinsam inkubiert. Die Inkubation wurde hierzu in einem molaren Verhältnis von 2:1, Impβ:Imp7, d. h. 3,1 mg (~32 µM) Impβ und 1,9 mg (~16 µM) Imp7 bei einem Gesamtvolumen von 500 µl in einem Eppendorf-cup 30 min lang bei 10° C durchgeführt.

Nach der Inkubation wurde eine analytische 10/30-Superdex-200-Gelfiltrationssäule kalibriert. Die Kalibrierung erfolgte durch Auftragen der beiden Kernimportrezeptoren jeweils allein. Anschließend wurde das Heterodimer aufgetragen. Die Kalibrierungsläufe von Impβ beziehungsweise Imp7 (Abb. 23) zeigen, daß das Auflösungsvermögen der analytischen S200-Säule ausreichend gut für die Trennung der beiden Proteine voneinander ist. Die Bildung des Heterodimers konnte durch die Auftrennung des inkubierten Bindungsansatzes (Abb. 24) belegt werden. Die Auflösung war hoch genug, um das Heterodimer vom Impβ-Überschuß zu trennen.

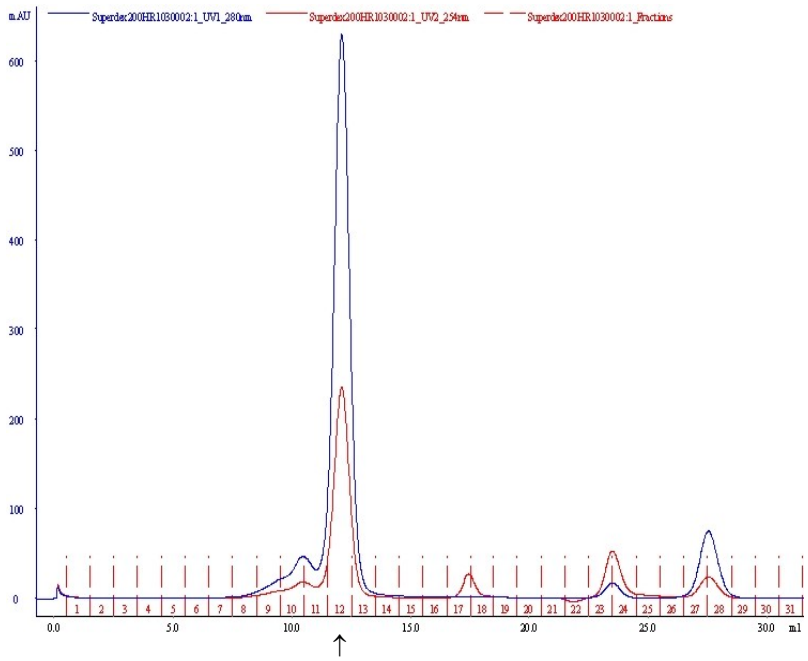
A



↑
Imp7 bei 11,7 ml

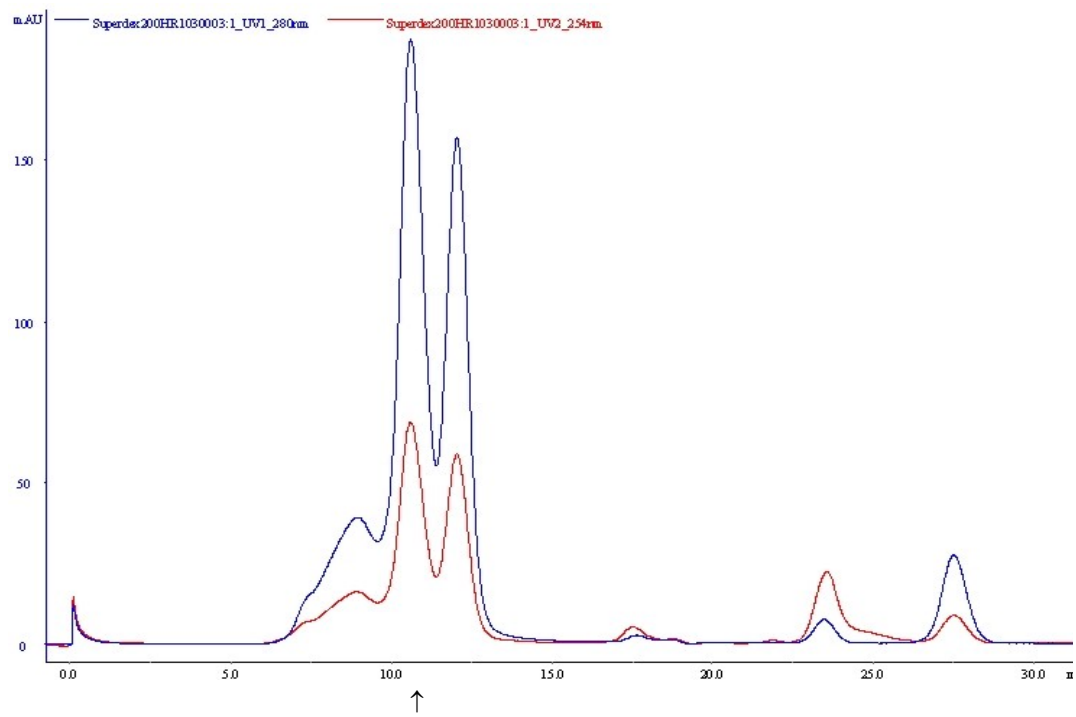
Abb. 23: Kalibrierung der analytischen Gelfiltration. Es wurde eine 10/30-S200-Gelfiltrationssäule benutzt. **(A)** Der Kalibrierungslauf von Imp7 zeigt, daß das Protein bei 11,7 ml im Maximum des Peaks eluiert Die Peaks davor resultieren aus zwischenzeitlich dimerisiertem Imp7. Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Rot: UV-Absorption bei 260 nm.

B



Impβ bei 12,2 ml

(B) Der Kalibrierungslauf von Impβ zeigt, daß dieses Protein bei 12.2 ml im Peakmaximum eluiert. Auch hier treten kleinere Peaks davor auf. Sie repräsentieren ebenfalls dimerisiertes Protein. Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Rot: UV-Absorption bei 260 nm.



Impβ/Imp7-Heterodimer bei 10,5 ml (Fraktion 11)

Abb. 21: Chromatogramm der Gelfiltration des vorinkubierten Impβ/Imp7-Heterodimers. Das Heterodimer eluiert deutlich vor den Monomeren (vgl. Abb. 20). Der zweite große Peak bei etwa 12,2 ml repräsentiert Impβ, das im Überschuß zugegeben worden war. Daß beide Peaks ähnlich hoch sind, spricht einerseits für eine nahezu vollständige Absättigung von Imp7 durch Impβ und andererseits für das Erreichen des angestrebten 2:1-Überschusses an Impβ. Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Rot: UV-Absorption bei 260 nm.

Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 25). Der erste Peak mit der Spitze bei 10,5 ml entsprach dem Heterodimer, der zweite Peak mit der Spitze bei 12,2 ml entsprach ungebundenem Impβ. Ungebundenes Imp7 lag praktisch nicht mehr vor. Dies bestätigte die richtige Konformation der Bindungsdomänen beider aufgereinigten Produkte.

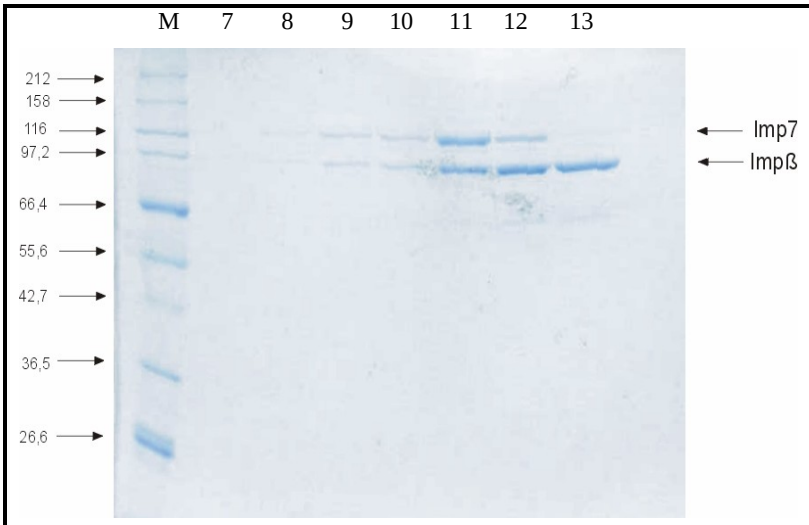


Abb. 25: SDS-PAGE der Gelfiltration des Impβ/Imp7-Heterodimers. Der erste Peak des Chromatogramms (Abb. 24) korrespondiert mit den Fraktionen 10 und 11. Fraktion 12 zeigt einen deutlichen Überschuß Impβ, da diese Fraktion neben dem absteigenden Schenkel des ersten Peaks zum Teil bereits den zweiten Peak repräsentiert. Dieser wird im Gel (Fraktion 13) als ungebundenes Impβ identifiziert. M = BR-Marker, die Nummern entsprechen den Fraktionen des Eluats.

3.2.3.2 Die Co-Aufreinigung von Impβ ohne Affinitätssequenz mit immobilisiertem $(His)_6$-Imp7

Um ein reines, aktives Heterodimer aus Impβ und Imp7 zu gewinnen und die Anzahl der His-Tags im Dimer von zwei auf einen zu reduzieren, wurde eine Co-Affinitätsreinigung gemäß 2.2.4.2 durchgeführt.

Dabei wurde zunächst 1 mg aufgereinigtes Imp7 (vgl. 3.1.3) auf einer HiTrapChelating Ni-NTA-Sepharose-Säule immobilisiert. Nun wurden 3 mg vorgereinigtes Impβ ohne Affinitätssequenz (vgl. 3.2.2) auf die Säule geladen und ungebundenes Impβ nach einer 15-minütigen Inkubation durch Spülen mit Waschpuffer entfernt. Schließlich wurde das Heterodimer im Imidazolgradienten eluiert (Abb. 26). Die Fraktionen des Eluats wurden anschließend durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 27).

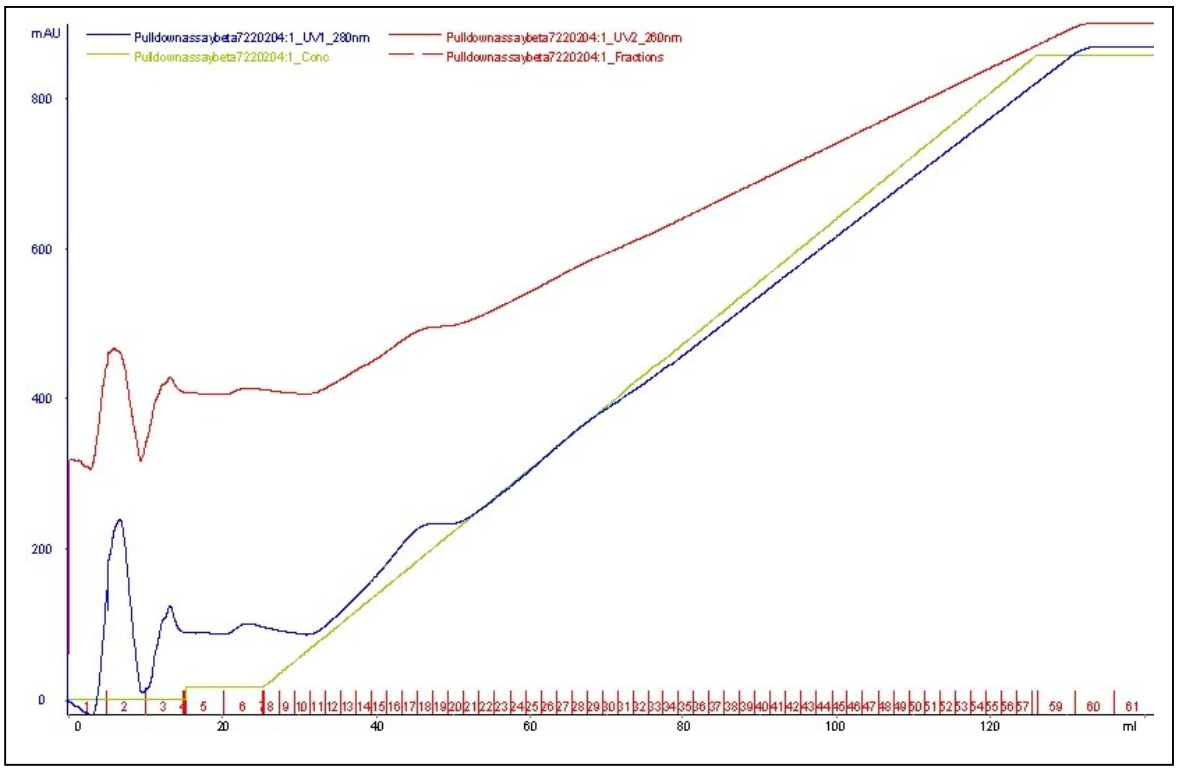


Abb. 26: Chromatogramm der Co-Affinitätsreinigung. Das Elutionsprofil nach Inkubation von Impβ und Imp7 zeigt, daß ungebundenes Impβ ohne His-Tag erwartungsgemäß bereits durch den Bindungs-/Waschpuffer eluiert wird. Der Impβ/Imp7-Komplex eluiert zwischen 80 und 100 mM Imidazol (Fraktionen 16-20). Die Stärke der Bindung des Komplexes über den His-Tag von Imp7 ist mit der von Imp7 allein absolut identisch. Der His-Tag interagiert offensichtlich nicht mit der Bindungsdomäne von Imp7 für Impβ. Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Rot: UV-Absorption bei 260 nm. Grün: Elutionsgradient.

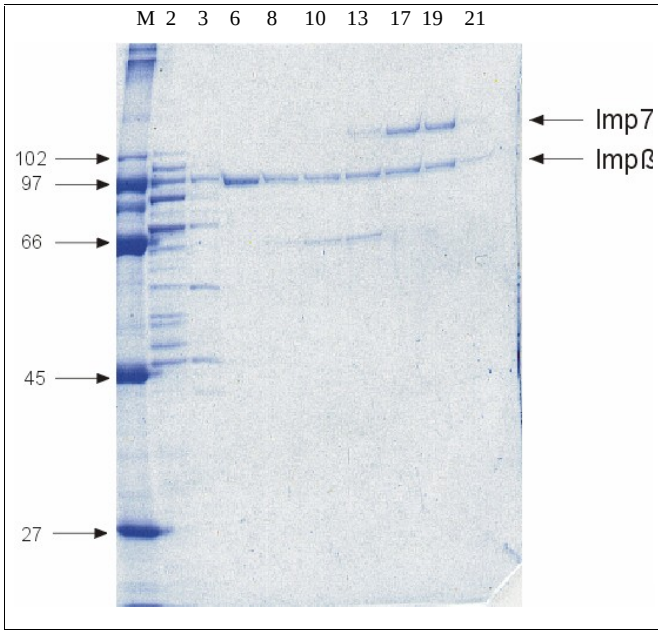


Abb. 27: SDS-PAGE-Analyse des Eluats des Pulldown Assays. In den Fraktionen 2 und 3 ist deutlich zu sehen, daß die Verunreinigungen aus der Präparation des ungetaggten Impβ hochselektiv entfernt wurden. Da Impβ im Überschuß zugesetzt worden war, ist es über eine relativ große Breite in den ersten Fraktionen zu finden. Das Heterodimer aus Impβ und Imp7 findet sich in den Fraktionen des Peaks im Elutionsgradienten (Abb. 23). Dies ist am äquimolaren Verhältnis beider Proteine in den Peak-Fraktionen zu erkennen. M = Marker, die Nummern repräsentieren die Fraktionen des Pulldown Assays.

Die Fraktionen, welche das Heterodimer enthielten, wurden vereinigt und für die Aktivitätstests mittels *in vitro* Import Assay (vgl. 3.3) auf 1,1 mg/ml (5 µM) ankonzentriert.

3.2.4 Bindungsstudie des ternären Impβ/Imp7/H1-Komplexes

Um eine stabile Bindung des Impβ/Imp7-Heterodimers zu bestätigen, wurde zunächst ein Pulldown Assay zur Co-Aufreinigung des Heterodimers durchgeführt. Leider war in diesem Versuchsansatz Imp7 zu einem großen Teil zuvor dimerisiert. Dies ergab sich aus dem Elutionsprofil der Gelfiltration von Imp7 (nicht dargestellt). Das Dimer ließ sich durch einen Impβ-Überschuß zum Teil wieder auflösen. Es bildete sich das Heterodimer in geringeren Mengen. Ein Imp7-Überschuß, der aus der Dimerisierung resultiert, war in der SDS-PAGE des ternären Komplexes immer noch zu erkennen (vgl. Abb. 29). Da sich das Elutionsverhalten von Imp7 und dem Impβ/Imp7-Heterodimer in der Affinitätschromatographie aber nicht unterscheiden, eluierten das noch vorhandene Imp7-Dimer und der Impβ/Imp7-Komplex gemeinsam. Da die Stöchiometrie von Impβ und Imp7 im Heterodimer bekannt ist, war dies jedoch für die Effektivität des Bindungstests unerheblich, zumal das Imp7-Dimer das Histon nicht binden kann (W. Albig, persönliche Mitteilung) und damit die Stöchiometrie nicht stören kann. Daher wurde dem Eluat des Pulldown Assays das Histon $H1^0$ dennoch zugesetzt und 30 min auf Eis inkubiert (vgl. 2.2.3.3). Die Detektion des ternären Komplexes erfolgte über eine präparative Gelfiltration (Abb. 28) und anschließende SDS-PAGE (Abb. 29). Die Bindungspartner sind deutlich zu erkennen.

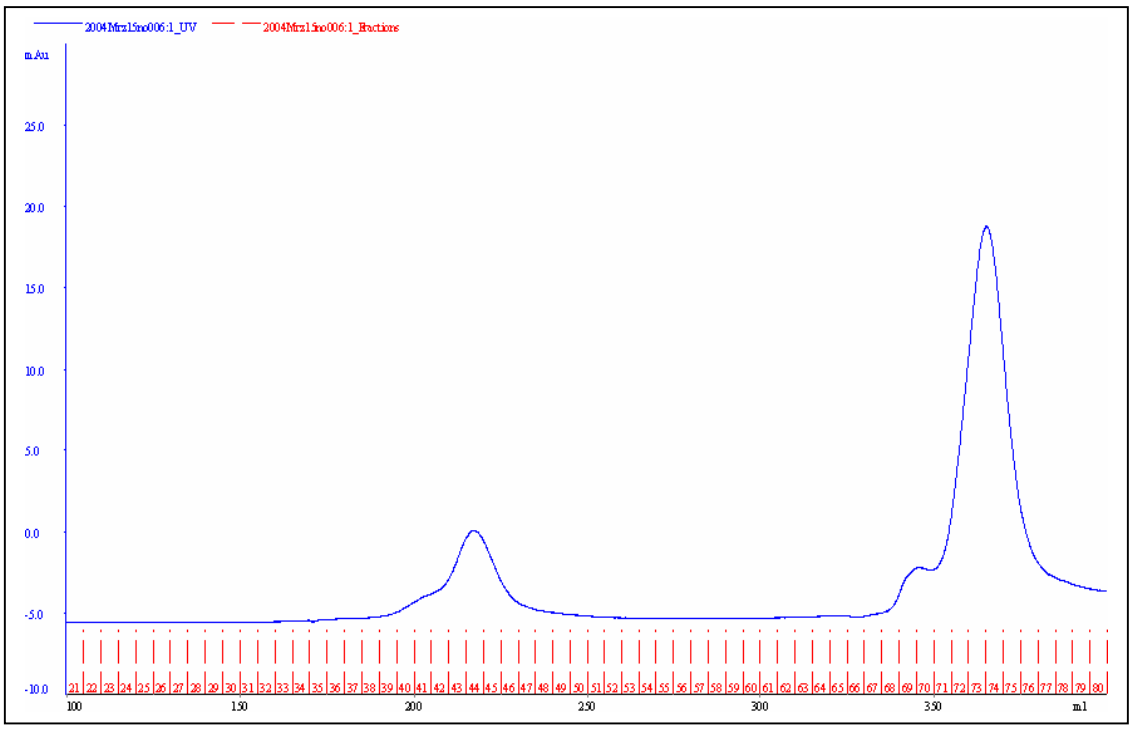


Abb. 28: Chromatogramm der Gelfiltration des ternären Impβ/Imp7/$H1^0$-Komplexes. Der Komplex eluiert bei einem Elutionsvolumen von etwa 170 ml. Dies entspricht 220 ml auf der Skalierung, da die Injektion der Probe bei 50 ml vorgenommen wurde. Blau: UV-Absorption bei 280 nm.

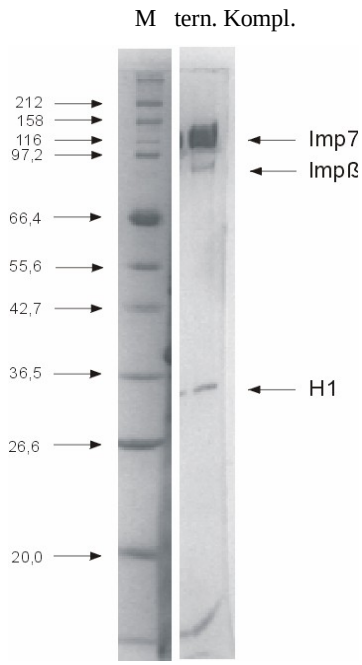


Abb. 29: SDS-PAGE der Gelfiltration des ternären Impβ/Imp7/H1^0-Komplexes. Die einzelnen Komponenten des ternären Komplexes treten in einer gemeinsamen Fraktion der Gelfiltration auf. Die in etwa gleichstarken Signale von Impβ und H1^0 deuten auf eine 1:1-Stöchiometrie hin. Der deutliche Imp7-Überschuß resultiert aus der Dimerisierung von Imp7 vor dem Pulldown Assay. Die unterste Bande ist die Lauffront des loading dye. M = Marker, tern. Kompl. = Fraktion des ternären Komplexes in der Gelfiltration.

3.3 Der *in vitro* Import Assay als Aktivitätsnachweis für Impβ, Imp7 und das Impβ/Imp7-Heterodimer

Zum Nachweis der Aktivität der aufgereinigten Kernimportrezeptoren Impβ, Imp7 und des aus der Co-Affinitätsaufreinigung gewonnenen Impβ/Imp7-Heterodimers wurde der *in vitro* Import Assay herangezogen, da er den effizientesten Aktivitätsnachweis bei Kernimportprozessen darstellt, der bislang bekannt ist. Die Importsubstrate rpL23a, H1^0 und H1.2^2 wurden rekombinant aus *E. coli* gewonnen und von Dr. Werner Albig (Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Bei der Durchführung wurde, wie unter 2.2.5 angegeben, verfahren. Beim H1-Import wurden sowohl H1^0 und H1.2^2 getestet, zwei Unterarten von H1, da zwischen beiden bezüglich des Imports aber kein Unterschied bestand, werden sie im Folgenden zusammenfassend mit dem Überbegriff H1 bezeichnet.

Bei der Untersuchung des Imports durch das Heterodimer aus Impβ und Imp7 sollte geklärt werden, ob die Bildung des Dimers vor der Bindung an das Histon für den Import zwingend notwendig ist, oder ob zunächst ein Importrezeptor an das Histon binden kann, bevor der zweite hinzukommt. Die Vorinkubation einzelner Transportfaktoren mit dem Histon H1 (Impβ/H1 und Imp7/H1) erfolgte bei 4° C 5 min lang. Erst danach wurde der zweite Rezeptor zugegeben.

Beim Test des vorher gebildeten Heterodimers wurde dieses direkt mit H1 inkubiert. Für den Import Assay mit H1 galt, daß der oder die Rezeptoren immer in Transportpuffer vorgelegt und erst danach das Histon hinzugesetzt wurde. Damit sollte ein Präzipitieren des Histons verhindert werden. Die Importaktivitäten von Impβ und Imp7 beim Import des ribosomalen Proteins rpL23a waren deutlich erkennbar (Abb. 30). Bei einer Konzentration der Importrezeptoren von 0,8 µM (Impβ) beziehungsweise 1 µM (Imp7) zeigt die FITC-Färbung hell gefärbte Nucleoli und nur wenig (Impβ) bis fast kein (Imp7) cytoplasmatisches Substrat. Da die Zusammensetzung der ribosomalen Untereinheiten im Nucleus stattfindet, genauer gesagt in den Nucleoli, belegen die stark gefärbten Nucleoli nach Zugabe von Impβ beziehungsweise Imp7 die korrekte Lokalisation der ribosomalen Proteine. Dies illustriert die Qualität der Importrezeptoren, was in Hinblick auf die Kristallisation von enormer Wichtigkeit ist. Die Negativkontrolle zeigte ebenfalls eine geringe Importaktivität, die daraus resultierte, daß beim Waschen nach der Permeabilisierung nur 80-90 % der löslichen Proteine des Cytosols entfernt werden konnten. Daher ist auch in der Negativkontrolle ein Basisimport zu sehen, der bei der Interpretation der Importaktivität berücksichtigt werden muß.

Der Import des Linker-Histons H1 fand nur in Anwesenheit des vorgebildeten Impβ/Imp7-Heterodimers mit genügender Effizienz statt (Abb. 31). Hier waren die Nuclei der einzelnen Zellen deutlich gefärbt. Die FITC-Färbung zeigte im Vergleich mit der DAPI-Färbung, daß das Histon nahezu vollständig kernlokalisiert war. Wurde einer der beiden Importrezeptoren mit H1 vorinkubiert, war der Import jedoch stark vermindert, im Falle der Vorinkubation mit Imp7 sogar vollständig unterbunden. Hier präzipitierte das Histon in großen Mengen im Cytosol, was bei der Vorinkubation mit Impβ nicht in solchem Maße beobachtet wurde. Hier war ein schwacher Import des Substrats zu erkennen. Wurde hingegen das aufgereinigte Heterodimer (vgl. 3.2.3.2) in einer Konzentration von 1µM verwendet, so war der Import von H1 sogar deutlich effektiver als in der Positivkontrolle mit Reticulocytenlysat, wo cytoplasmatisches H1 noch deutlich detektiert werden konnte. Das Heterodimer importierte das Histon so vollständig in den Nucleus, daß keinerlei cytoplasmatisches Substrat mehr vorhanden war. Der Import überstieg bereits mit einer Impβ/Imp7-Konzentration von 0,5 µM das Niveau der Positivkontrolle (Daten nicht gezeigt).

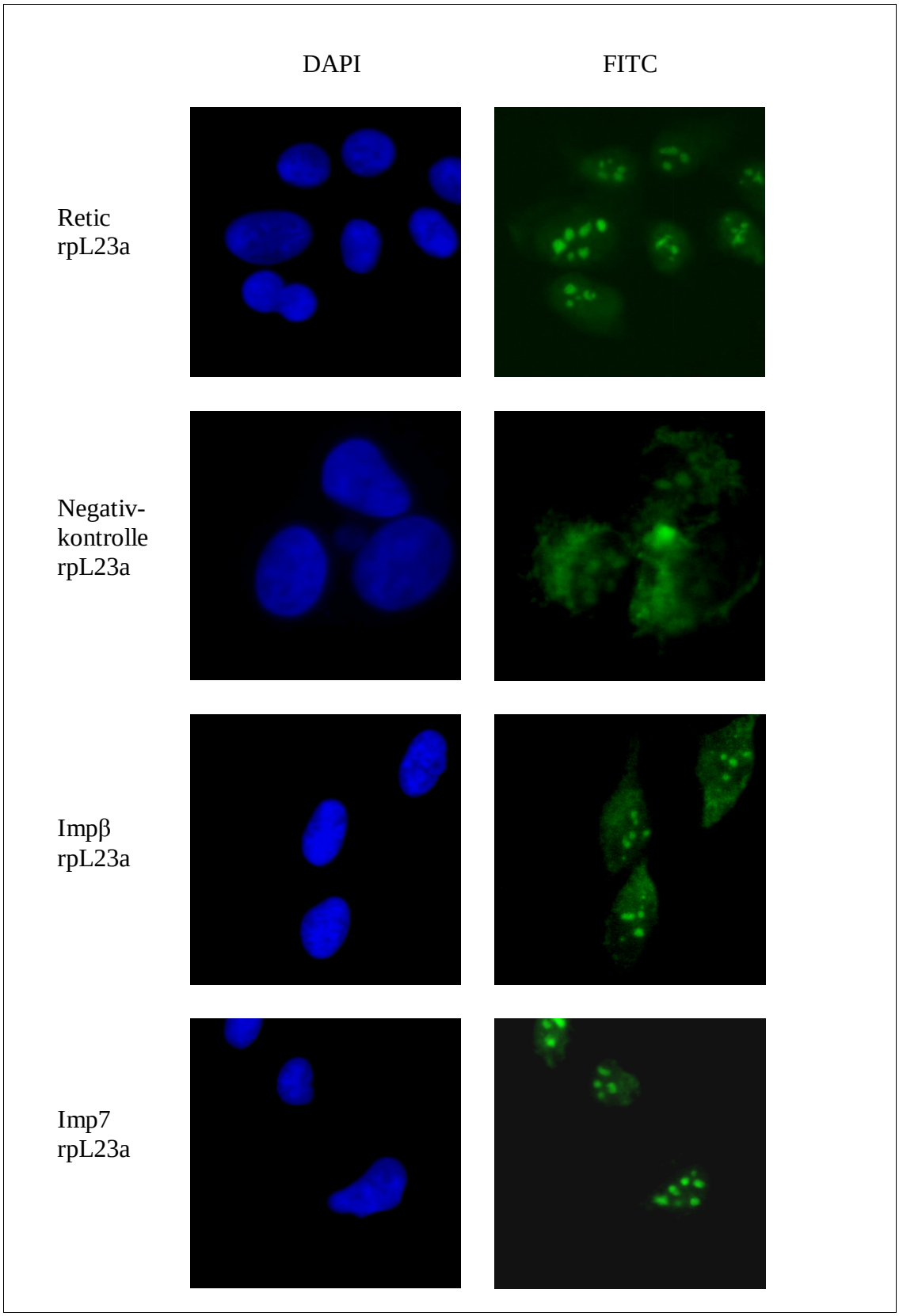


Abb. 30: Import von rpL23a durch Impβ und Imp7. Beide getesteten Importrezeptoren vermitteln einen deutlichen Import des Substrats. Imp7 zeigt dabei eine höhere Aktivität als Impβ. Dies ist an der Fluoreszenz von cytoplasmatischem L23a beim Import durch Impβ zu erkennen. Beim Import von L23a durch Imp7 ist das Substrat fast vollständig im Nucleus. Retic = Reticulocytenlysat.
Konzentrationen: Impβ: 0,8 µM, Imp7: 1µM, L23a: 0,5 µM.

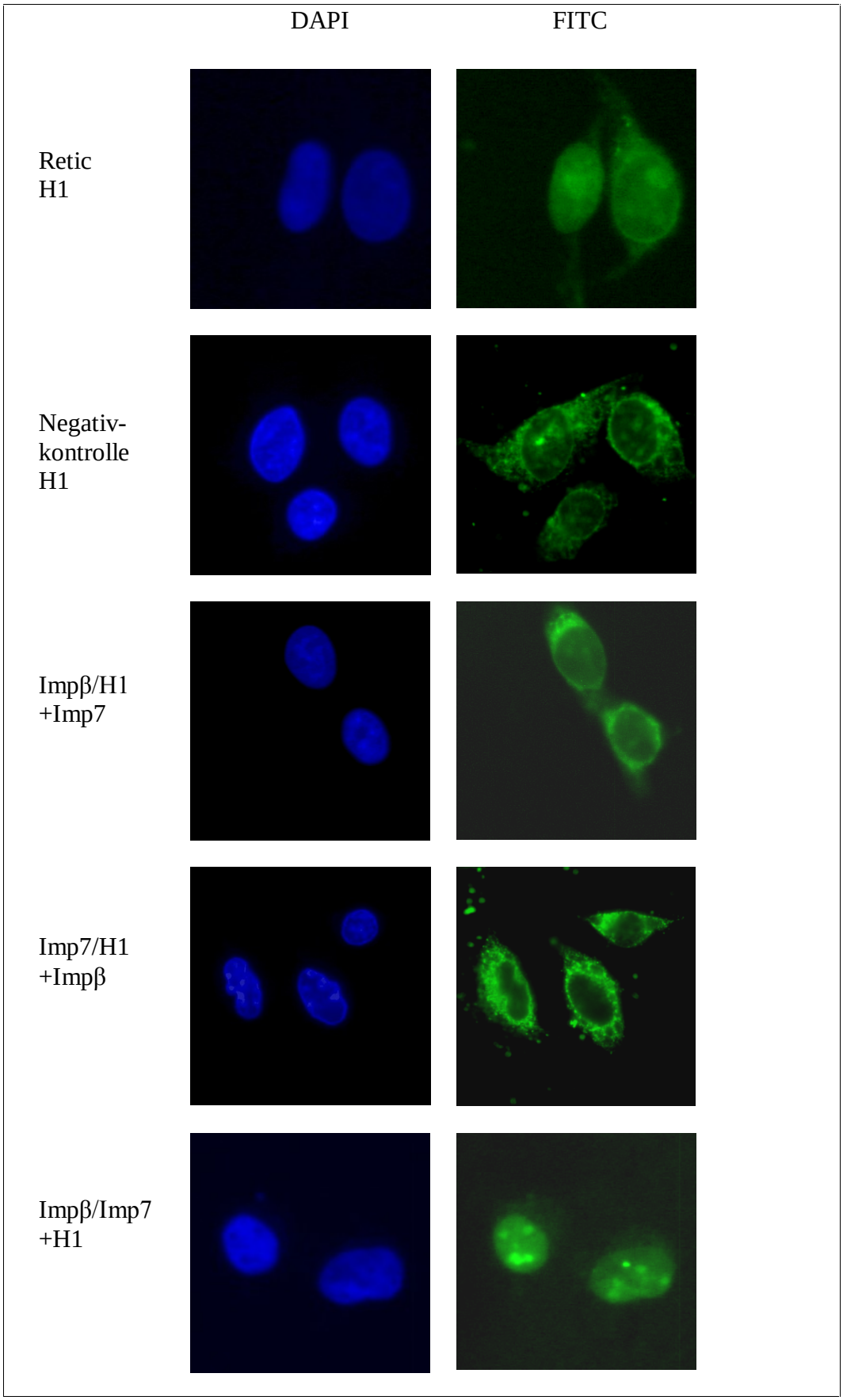


Abb. 31: Import des Linker-Histons H1 durch das Impβ/Imp7-Heterodimer. Wird Impβ zuerst mit H1 inkubiert, findet nur verminderter Transport statt. Bei einer Vorinkubation von Imp7 und H1 ist kein H1-Import zu sehen. Nur das vorher gebildete Dimer aus Impβ und Imp7 kann H1 effektiv importieren. Auffällig ist hier das ausgeprägte Präzipitat des Histons. Retic = Reticulocytenlysat. Konzentrationen: Impβ: 1 µM, Imp7: 1 µM, Impβ/Imp7: 1 µM, H1: 0,5 µM.

3.4 Kristallisation von Importin 7

Die Kristallisation des Kernimportrezeptors Imp7 sollte die Strukturaufklärung des ungebundenen Rezeptors ermöglichen. Beim Vergleich mit Strukturen von substratgebundenem Imp7 könnte so der Mechanismus der Substratbindung aufgeklärt werden.
Für die Kristallisationsansätze wurde das in dieser Arbeit aufgereinigte Imp7 aus *Xenopus laevis* mit His-Affinitätssequenz verwendet (vgl. 3.1).

3.4.1 Kristallisation von Imp7 ohne Bindungspartner

Nachdem Imp7 in ausreichender Reinheit gewonnen worden war, wurden die ersten Kristallisationstests durchgeführt.
Dazu wurden folgende Eingangsbedingungen (engl. initial screens) im sitzenden Tropfen mit einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml (40 µM) Imp7 im Kristallisationsansatz bei 20° C pipettiert (vgl. 2.2.6.1), die Abkürzungen für die Initial Screens sind in Klammern angeführt:

- Crystal Screen 1 (CS1)
- Crystal Screen 2 (CS2)
- Crystal Screen Lite (CSL)
- Crystal Screen Cryo (CSC)
- Crystal Screen PEG/Ion (CSPI)
- JB Screens 1-10 (JB1-10)
- Magic Screen (MS)
- Footprint Screen (FS)
- Structure Screen (SS)

Nach sieben Tagen waren in der Bedingung CS1/41 (Abb. 32) kleine Kristalle gewachsen, die in ihrer Form an Diamanten erinnerten. Bei der Auflistung der Bedingungen wird auf die Angabe des Puffers der Imp7-Präparation (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl) verzichtet.

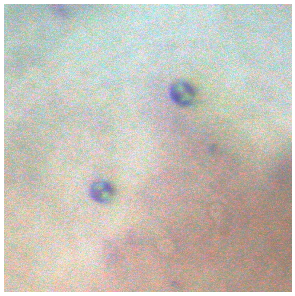


Abb. 32: Kleine Proteinkristalle in CS1/41. Aufnahme mit einer Digitalkamera mit vorgespanntem Polarisationsfilter. Nach sieben Tagen waren in dieser Bedingung kleine diamantförmige Proteinkristalle gewachsen. Die Kristalle haben einen Durchmesser von ~20µM.

Bedingung im Tropfen:	50 mM	NaHEPES pH 7,5
	10 % (v/v)	PEG4000
	5 % (v/v)	Isopropanol
	Proteinkonzentration:	40 µM
	Temperatur:	20° C

Kristalle der gleichen Form und Größe wuchsen auch in CS1/44 und CS1/47. Die Bedingungen in den Tropfen sind:

CS1/44:	0,1 M	MgFormiat	CS1/47:	1 M Ammoniumsulphat
				50 mM NaAcetat pH 4,6

Es ließ sich nicht nachweisen, daß das kristallisierte Protein tatsächlich Vollängen-Imp7 ist, da die Kristalle zu klein für das zur Verfügung stehende Diffraktometer sind. Aufgrund ihrer geringen Größe konnten sie auch nicht durch SDS-PAGE analysiert werden. Daher wurden die Bedingungen CS1/41, CS1/44 und CS1/47 in einem systematischen Raster geringfügig verändert, und mit Imp7 aus der gleichen Aufreinigung versucht, ob sich die Kristalle reproduzieren oder sogar vergrößern lassen. Dabei wurden die Salz- und Präzipitanskonzentrationen nach oben und nach unten verändert. Zusätzlich wurden bei einigen Salzen die Kationen durch andere Metalle der gleichen oder einer benachbarten Hauptgruppe substituiert, z. B. NaFormiat oder KFormiat anstelle von MgFormiat. Schließlich wurden auch die pH-Werte und die Puffer verändert. Das Rastern um die Bedingungen herum führten aber nicht zu einer neuen Kristallbildung. Daher wurde „Macro-Seeding“ (vgl. 2.2.6.2) durchgeführt, um auf diese Weise neue Kristalle zu erzeugen. Auch dies blieb jedoch ohne Ergebnis.

In etwa 70-80 % der pipettierten Eingangsbedingungen war ein ausgeprägtes, dunkelbraunes bis schwarzes Präzipitat zu sehen. Dies stellt in der Regel präzipitiertes und vor allem denaturiertes Protein dar. Daher wurden die Eingangstests mit frisch aufgereinigtem Imp7 wiederholt, allerdings mit einer Konzentration von nur noch 2,5 mg/ml (~20 µM) Imp7 im Tropfen.

Dadurch konnte die Präzipitatbildung tatsächlich signifikant gesenkt werden. Denaturiertes Protein fand sich nur noch in etwa 35 % aller Bedingungen.

Nach etwa einer Woche waren in Bedingung CS2/2 größere Aggregate zu sehen, die klar und durchsichtig waren. Auf ihnen wuchsen im Lauf der nächsten 3 Tage kleine Nadeln (Abb. 33)

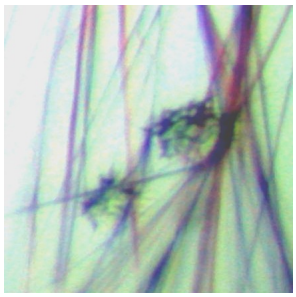


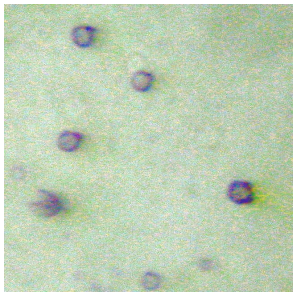
Abb. 33: Kristallbildung in CS2/2. Aufnahme mit einer Digitalkamera und vorgespanntem Polarisationsfilter. Es sind deutlich seeigelförmige Gebilde zu erkennen. Der Kern ist amorphes Protein, auf diesem Kern wuchsen schmale Kristallnadeln. Die langen dunklen Kristalle bestehen aus IzIt-Proteinfärber, der nach einem Tag lange, kräftige Nadeln bildete.

Bedingung im Tropfen:		
	50 mM	CTAB
	0,25 M	NaCl
	50 mM	$MgCl_2$
	Proteinkonzentration:	20 µM
	Temperatur:	20° C

Auch hier wurde um die Bedingung gescreent. Dabei wurde die Temperatur variiert (20° C und 4° C), die NaCl-Konzentration verändert, $MgCl_2$ gegen $CaCl_2$ und $MgSO_4$ und schließlich CTAB gegen SDS substituiert oder ganz weggelassen. Da die Zugabe von SDS wider Erwarten nicht eine vollständige Präzipitation von Imp7 zur Folge hatte, sondern vielmehr erneut klare, tunnelartige Aggregationen auslöste, wurde daraus geschlossen, daß möglicherweise nur ein bestimmter Zusatz fehlt. Solch ein Zusatz könnte eine katalytische Funktion während der Kristallbildung wahrnehmen oder aber auch aktiv in die Kristallstruktur integriert werden. Aus diesem Grund wurden ausgehend von der Bedingung CS2/2 nicht nur die Additive Screens 1-3 von Hampton Research getestet, sondern auch der Detergent Screen 1 der gleichen Firma. Dabei wird das Additiv oder Detergens 1:10 im Tropfen verdünnt.

In den meisten Bedingungen waren amorphe, aber klare und damit nicht denaturierte Proteinaggregationen zu beobachten. Bei 4° C schien die Löslichkeit von Imp7 erhöht, was an der geringeren Aggregatebildung zu erkennen war. In manchen Fällen blieb der Tropfen fast klar.
In einigen Bedingungen kam es aber zu einer neuen Kristallbildung (Abb. 34).

CS2/2 +
Add1/11

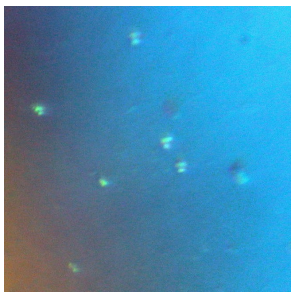


Bedingung im Tropfen:

50 mM	CTAB
0,25 M	NaCl
50 mM	$MgCl_2$
3 % (v/v)	Ethylenglykol

Proteinkonzentration:	20 µM
Temperatur:	20° C
Kristalldurchmesser:	15-20 µm

CS2/2+
Add1/13

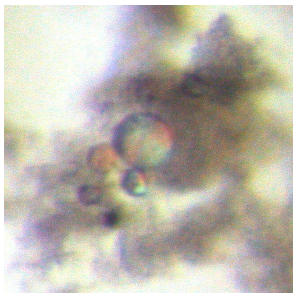


Bedingung im Tropfen:

50 mM	CTAB
0,25 M	NaCl
50 mM	$MgCl_2$
3 % (w/v)	1,6-Hexandiol

Proteinkonzentration:	20 µM
Temperatur:	20° C
Kristalldurchmesser:	10-20 µm

CS2/2+
Det1/6



Bedingung im Tropfen:

50 mM	CTAB
0,25 M	NaCl
50 mM	$MgCl_2$
0,09 mM	Triton X-100

Proteinkonzentration:	20 µM
Temperatur:	20° C
Kristalldurchmesser:	15-20 (40) µm

Abb. 34: Kristallbildung in Gegenwart verschiedener Additive und Triton X-100. Aufnahmen mit einer Digitalkamera und vorgespanntem Polarisationsfilter. Bemerkenswerterweise treten die gleichen Kristallformen auf, die vorher in anderen Bedingungen schon beobachtet wurden (vgl. Abb. 30 und 31). Auch hier sind die Kristalle klein mit einem nahezu konstanten Durchmesser von 20 µm. Lediglich in Gegenwart des nicht-ionischen Detergens Triton X-100 sind auch größere Gebilde zu sehen. Auf dem untersten Bild ist ein Solches zentral dargestellt. Bei diesen Formationen könnte es sich aber auch um Phasentrennungen handeln. Daher ist der Durchmesser mit 40 µm in Klammern gesetzt.

Es wurde versucht, mit Protein aus derselben Aufreinigung die Kristalle zu reproduzieren, was aber nicht gelang. Auch Reproduktionstests bei 4° C schlugen fehl, die Löslichkeit von Imp7 schien dadurch eher gesteigert zu werden. Micro- und Macro-Seeding (vgl. 2.2.6.2 und 2.2.6.3) blieben ohne Erfolg. In sämtlichen Reproduktionsbedingungen und auch in denen, in welche Kristallisationskeime gesät worden waren, waren erneut amorphe, klare Proteinaggregationen zu beobachten, die offensichtlich zur Kristallisation tendieren, ohne aber eine neuerliche Kristallbildung zu zeigen.

3.4.2 Co-Kristallisation von Imp7 mit Impβ als Heterodimer

Die Co-Kristallisation von Imp7 mit Impβ sollte einerseits die Kristallisation von Imp7 schlicht erleichtern, andererseits aber auch das Studium der Interaktion beider Bindungspartner durch die Röntgenkristallographie ermöglichen. Besonders im Vergleich mit der Struktur von Imp7 allein wären mögliche Konformationsänderungen beziehungsweise Neuordnungen der Bindungsdomänen analysierbar.
Für die Co-Kristallisation wurde Impβ mit N-terminalem His-Tag verwendet, welches von Anja Strasser (Göttingen) zur Verfügung gestellt worden war, da zu diesem Zeitpunkt die Aufreinigung von ungetaggtem Impβ noch nicht etabliert war.
Die beiden Proteine wurden vor dem Pipettieren der Initial Screens äquimolar gemischt mit einer Endkonzentration von 10 mg/ml (~40 µM) und für 30 min bei 10° C inkubiert. Die Kristallisationsansätze wurden bei einer Temperatur von 20° C pipettiert.
Folgende Initial Screens wurden verwendet:

- Crystal Screen 1
- Crystal Screen 2
- Crystal Screen Lite
- Crystal Screen Cryo
- Crystal Screen PEG/Ion
- JB Screens 1-10
- Footprint Screen

Schon nach einem Tag war in über 50 % aller Wells nahezu alles Protein ausgefallen. Nach etwa 1 Woche fand sich bereits in über 70 % aller Ansätze dunkelbraunes, also denaturiertes Präzipitat. Eine Kristallbildung war in keiner Bedingung zu erkennen. Insgesamt bot sich ein ähnliches Bild wie bei den ersten Kristallisationsversuchen von Imp7 allein (vgl. 3.4.1).
Da die Präzipitatbildung ein großes Problem darstellte, wurden die selben Eingangsbedingungen auch bei 4° C pipettiert. Die Präzipitatbildung ging erkennbar zurück, zur Bildung von Kristallen kam es aber nicht.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Diplomarbeit bestand darin, eine Expressions- und Aufreinigungsstrategie für den Kernimportrezeptor Importin 7 aus *Xenopus laevis* zu etablieren, um das in hochreiner Form gewonnene Protein zu kristallisieren. Dies sollte röntgenkristallographische Analysen der Struktur des Proteins ermöglichen. Weiterhin sollte auch das Heterodimer aus Importin 7 und seinem bekannten Bindungspartner Importin β zur Kristallisation gebracht werden. Dazu sollte auch für Importin β eine Expression und Aufreinigung etabliert werden. Da dadurch eine Co-Aufreinigung beider Rezeptoren ermöglicht werden sollte, mußte Impβ in einer Form ohne Affinitätssequenz vorliegen. Dies würde eine Co-Affinitätsaufreinigung mit immobilisiertem Imp7 erlauben. So ließe sich das Heterodimer in hochreiner Form gewinnen, was für die Kristallisation unerläßlich ist. Die Etablierung der Expression und Aufreinigung von rekombinantem Imp7 und Impβ gelang (vgl. 3.1 und 3.2), ebenso wie die Co-Affinitätsaufreinigung beider Rezeptoren (vgl. 3.2.3). Obwohl es im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht gelungen ist, Imp7 für die Röntgenkristallographie in einer Form zu kristallisieren, welche Röntgenbeugungsexperimente ermöglicht, konnten erste Bedingungen für Imp7 gefunden werden, in denen sich Nucleationskeime und kleine Kristalle bildeten (vgl. 3.4). Da das Impβ/Imp7-Heterodimer den funktionellen Importrezeptor für das Linker Histon H1 darstellt, sollte schließlich die Bildung des ternären Komplexes aus Impβ, Imp7 und H1 bestätigt werden, um die gewonnenen Erkenntnisse für eine Aufreinigung des ternären Komplexes zu nutzen, damit dieser ebenfalls kristallisiert werden kann. Aus dem Vergleich Der Strukturen von Imp7, dem Impβ/Imp7-Heterodimer und dem Impβ/Imp7/H1-Komplex ließen sich dann die strukturellen Veränderungen von Imp7 in der Interaktion mit weiteren Bindungspartnern verfolgen. Hierzu komplementär sollten auch einige Aspekte beim H1-Import durch das Impβ/Imp7-Heterodimer durch den *in vitro* Import Assay charakterisiert werden. Im Zentrum des Interesses stand hierbei die Untersuchung der Chaperonaktivität von Imp7 beim Import des Histons. Dies sollte die spätere Analyse der Kristallstruktur des Impβ/Imp7-Heterodimers und des ternären Komplexes aus Impβ, Imp7 und H1 erleichtern.

Es gelang, die Rollen von Imp7 und Impβ im Import des Histons H1 näher zu beleuchten. Die gewonnenen Erkenntnisse konnten dazu herangezogen werden, eine Hypothese zu entwickeln, die das Modell des H1-Imports verfeinern könnte. Schließlich gelang auch die Aufreinigung des ternären Impβ/Imp7/H1-Komplexes, die allerdings für die Kristallisation noch optimiert werden muß (vgl. 3.2.4).

4.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Importin 7

Für die Kristallisation von Imp7 aus *Xenopus laevis* werden große Mengen rekombinanten Proteins benötigt. Hierzu sollte ein Protokoll entwickelt werden, das es ermöglicht, Imp7 in *E. coli* zu exprimieren und aufzureinigen. Dies sollte möglichst zeitsparend und mit möglichst großen Ausbeuten durchführbar sein.

Die Synthese von rekombinantem Imp7 gestaltete sich in den meisten der getesteten *E. coli*-Stämme sehr schwierig. Möglicherweise hat Imp7 toxische Eigenschaften in *E. coli*, da es basische Proteine und auch zum Teil DNA binden kann (Rout et al., 1997; Jäkel und Görlich, 1998; Goff, 2001). Die Verwendung von *E. coli* SG13009 löste dieses Problem. Dieser Stamm wird vom Hersteller Qiagen für die Expression toxischer Proteine empfohlen. Darüberhinaus ist dieser Stamm für die Expression von Proteinen in pQE-Vektoren besonders geeignet, da seine Transkriptionsmaschinerie auf solche Vektoren zugeschnitten ist. Durch die Zugabe von 2 % Glucose konnte die Basisexpression deutlich gesenkt und damit die Selektion von Deletionsmutanten verhindert werden (vgl. 2.2.3.4.2). Dies steigerte die Expression von Vollängen-Imp7 erheblich. Bei der Verwendung von SG13009 (pREP4) wurde auf die Zugabe von Glucose verzichtet, da dieser Stamm auch ohne Glucose eine gute Expression des Vollängenproteins erkennen ließ (vgl. 2.2.3.1). Das Herabsenken der Expressionstemperatur auf 15° C verlangsamte das Wachstum der Kulturen zwar erheblich, da es hemmend auf die Teilungsrate der Bakterien wirkt, steigerte aber die Löslichkeit des Produkts um den Faktor 4-5. Der Zusatz von Ethanol zur induzierten Kultur erhöhte zusätzlich die Löslichkeit des Proteins, und zwar von etwa 30 auf 50 %. Durch die Zugabe von K_2HPO_4 konnte die Löslichkeit zusätzlich geringfügig gesteigert werden.

Da der Vektor pQE-9 für eine N-teminale His-Sequenz codiert, konnte Imp7 über eine Affinitätschromatographie mit Nickel als Koordinationspartner selektiv aufgereinigt werden (vgl. 3.1.3.2 und Abb. 14 und 15). Durch den Zusatz von 4 % Glycerin und einer Salzkonzentration von 300 mM NaCl im Lysis-Puffer konnten unspezifische Interaktionen von Proteinen im Zellysat mit der Ni-NTA-Sepharose weitgehend abgebaut werden.

So war die abschließende Gelfiltration des Eluats ausreichend, um Imp7 in hochreiner Form zu gewinnen (vgl. 3.1.3.3 und Abb. 16 und 17). Das Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 60 kDa, wahrscheinlich HSP60, konnte weitestgehend entfernt werden. Bei der Gelfiltration zeigte sich außerdem, daß ein Teil von Imp7 unerwartet früh eluiert. Das Elutionsvolumen dieses ersten Imp7-Peaks entspricht einem Molekulargewicht von 200-250 kDa. Dies spricht dafür, daß es sich hierbei um dimerisiertes Imp7 handeln könnte, da ein ähnliches Verhalten ebenso von Impβ bekannt ist (A. Dickmanns, 2003, persönliche Mitteilung).

In der SDS-PAGE konnte dieser Peak als Imp7 identifiziert werden (vgl. Abb. 17). Das Dimer dissoziierte nur zu einem geringen Teil durch die Inkubation mit Impβ, was darauf hindeuten könnte, daß auch monomeres, aber falsch gefaltetes Imp7 in diesem Peak vertreten war (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grunde wurden nur die Fraktionen des zweiten Imp7-Peaks vereinigt und ankonzentriert. Die Verunreinigungen im Produkt machten insgesamt deutlich weniger als 5% des Gesamtproteins aus (vgl. Abb. 17). Die Reinheit und die Ausbeute waren also für die Kristallisation ausreichend. Bei der Verwendung des Vektors pQE-80Ndecahis-Imp7 ergab sich ein vergleichbares Bild. Von seiner weiteren Verwendung wurde abgesehen, da die ersten Kristallisationsbedingungen, in denen sich Nucleationskeime gebildet hatten, mit $(His)_6$-Imp7 pipettiert worden waren, der Vektor pQE-80Ndecahis-Imp7 aber für $(His)_{10}$-Imp7 codiert.

4.2 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Importin β

Um das Impβ/Imp7-Heterodimer für die Kristallisation in hochreiner Form zu gewinnen, bestand eine Möglichkeit darin, rekombinantes Impβ ohne Affinitätssequenz zu exprimieren und aufzureinigen. So würde eine Co-Affinitätsaufreinigung zur Gewinnung beider Rezeptoren als hochreines Dimer möglich.

4.2.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Importin β ohne Affinitätssequenz

Beide getesteten *E. coli*-Stämme, M15 und SG13009 (pREP4), exprimierten Impβ in für die Kristallisation absolut ausreichenden Mengen (vgl. Abb. 18). Nach der Optimierung der Expressionsbedingungen betrug die Ausbeute an Impβ aus SG13009 (pREP4) etwa 80 mg pro Liter 2YT-Kultur (vgl. 3.2.2 und Tab. 8). Die Expression in *E. coli* M15 wäre vermutlich ebenso erfolgreich gewesen. Aus praktischen Gründen wurde aber auch hier, wie bei der Expression von Imp7, der Stamm SG13009 (pREP4) verwendet, da so nur von diesem Stamm kompetente Zellen hergestellt werden mussten.

Die Zugabe von Glucose vor der Induktion (vgl. 2.2.3.4.2) war hier nötig, da die Basisexpression selbst in Gegenwart des pREP4-Plasmids (vgl. 2.2.3.1) so hoch war, daß es aufgrund der Selektion von Deletionsmutanten zu empfindlichen Ausbeuteeinbußen an Vollängenprotein kam. Auch für Impβ galt, daß eine niedrige Expressionstemperatur die Zellvermehrung zwar verlangsamte, die Löslichkeit des Produkts aber extrem steigerte.

Da Impβ ohne Affinitätssequenz in pQE-60 hineinkloniert worden war, mußte eine Aufreinigungsstrategie entwickelt werden, die die natürlichen Eigenschaften des Proteins ausnutzt, um dieses von anderen Verunreinigungen zu trennen.
Die Aufreinigung über die Anionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sepharose war hierfür ein gutes Mittel. Die verwendete Diethylaminoethyl-Sepharose-Säule besitzt eine hohe Bindungskapazität und ist ein schwacher Anionentauscher, dessen Trennverhalten ausreichend war, um viele Verunreinigungen beseitigen zu können. Die Wahl des pH-Wertes von 6,2 im Laufpuffer war dabei entscheidend, da Impβ hier im Gradienten eluiert wurde und so am wenigsten Fremdprotein miteluierte (vgl. 3.2.2.2 und Abb. 19 und 20). Dennoch war aber zu viel Fremdprotein in den Impβ-haltigen Fraktionen enthalten. Diese Verunreinigungen konnten durch eine Gelfiltration zu einem großen Teil entfernt werden, obwohl auch nach der Gelfiltration der Anteil der Verunreinigungen am Gesamtprotein immer noch etwa 20 % betrug (vgl. 3.2.2.3 und Abb. 21 und 22). Ein weiterer Reinigungsschritt, wie z. B. die Verwendung einer hydrophoben Interaktionssäule mit Phenylsepharose wäre möglich gewesen, da Impβ leicht hydrophobe Eigenschaften hat (A. Strasser, persönliche Mitteilung). Darauf wurde aber verzichtet, da die Reinheit nach der Gelfiltration für die Co-Affinitätsaufreinigung mit immobilisiertem Imp7 völlig ausreichend war. Es war hier nämlich vornehmlich wichtig, die Menge an Impβ für die Aufreinigung des Heterodimers mit Imp7 in etwa einschätzen zu können. Die Ausbeute an rekombinantem Impβ war schließlich selbst unter Berücksichtigung der Verunreinigungen hoch genug, um eine Co-Kristallisation mit Imp7 nach der gemeinsamen Affinitätsaufreinigung vornehmen zu können (vgl. Tab.8).

4.2.2 Co-Aufreinigung von Importin β und Importin 7

Die Zugabe von $(His)_6$-Impβ im Überschuß zu $(His)_6$-Imp7 mit anschließender Inkubation führte zur Bildung eines stabilen Heterodimers aus beiden Rezeptoren, welches über eine Gelfiltration mit anschließender SDS-PAGE visualisiert werden konnte (vgl. Abb. 26 und 27). Allerdings waren die Ausbeuteverluste bei dieser Methode für eine Kristallisation zu hoch, da lediglich die Spitze des Dimer-Peaks hätte weiterverwendet werden können. Im absteigenden Schenkel dieses Peaks trat nämlich bereits das Impβ-Monomer auf. Die Co-Elution eines Impβ-Dimers konnte ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Dieses Problem konnte durch die Co-Affinitätsaufreinigung umgangen werden, da bei vollständiger Absättigung des immobilisierten Imp7 ausschließlich das Heterodimer im Imidazolgradienten eluierte (vgl. 3.2.3.2 und Abb. 26 und 27). So konnte die richtige Stöchiometrie sichergestellt werden.

Für spätere Co-Affinitätsaufreinigungen des Heterodimers wäre es auch möglich, Impβ mit His-Sequenz zu immobilisieren und Imp7 ohne Affinitätssequenz daran zu binden. Da das Protein ohne Affinitätssequenz aber im Überschuß zugesetzt werden muß und die Ausbeute an Impβ diejenige an Imp7 deutlich überstieg (vgl. Tab. 5 und 8), wurde auf den umgekehrten Aufreinigungsweg verzichtet.

4.2.3 Aufreinigung des ternären Impβ/Imp7/H1-Komplexes

Wie anhand der Bindungsstudie des ternären Komplexes aus Impβ, Imp7 und $H1^0$ deutlich wurde (vgl. 3.2.4 und Abb. 28 und 29), ist das Vorliegen des Imp7-Monomers für die Co-Affinitätsaufreinigung mit Impβ zwingend notwendig, da sich das Imp7-Dimer in dieser Aufreinigung meist genauso verhält wie das Impβ/Imp7-Heterodimer (vgl. 3.1.3.2 und 3.2.4). Sie können nicht voneinander getrennt werden, auch nicht durch eine anschließende Gelfiltration, da sie in ihrer Größe zu ähnlich sind. Das Imp7-Dimer hat ein Molekulargewicht von 239 kDa, das Impβ/Imp7-Heterodimer eines von 217 kDa. Bei der Gelfiltration des Bindungsansatzes mit dem Histon $H1^0$ konnte der ternäre Komplex aus Impβ, Imp7 und $H1^0$ ebenfalls nicht vom Imp7-Dimer getrennt werden, da sie mit 238 beziehungsweise 239 kDa ein nahezu identisches Molekulargewicht besitzen.
Allerdings konnte in der vorausgehenden Co-Affinitätsaufreinigung (vgl. 3.2.3.2 und 4.2.2) belegt werden, daß Impβ und monomeres Imp7 in einer 1:1-Stöchiometrie aneinander binden. Da deshalb die Intensität des Signals und damit die Menge an Impβ indirekt auch derjenigen von im Heterodimer gebundenem Imp7 entspricht, kann so von der Signalintensität von Impβ in den Fraktionen des ternären Impβ/Imp7/$H1^0$-Komplexes auf die Menge an in diesem Komplex gebundenem Imp7 geschlossen werden. Da das Signal von Impβ in der SDS-PAGE-Analyse des Gelfiltrationseluats exakt genauso deutlich ist, wie jenes des Histons, legt dies eine für alle drei Bindungspartner äquimolare Stöchiometrie nahe (vgl. Abb. 29). Das in der Co-Affinitätsaufreinigung gebildete Heterodimer ist also in der Lage, das Histon H1 mit hoher Effizienz zu binden. Deshalb stört der Überschuß des Imp7-Dimers nicht bei der Interpretation der SDS-PAGE (Abb. 29). Die Bildung des ternären Komplexes konnte daher bestätigt werden. Er ließ sich stabil aufreinigen.
Um den ternären Komplex mit $H1^0$ für die Kristallisation aufzureinigen, ist es notwendig, daß vor der Co-Affinitätsaufreinigung beide Importrezeptoren frisch präpariert sind und als aktive Monomere vorliegen. Nur so kann es zu einer vollständigen Sättigung von immobilisiertem Imp7 mit Impβ kommen. Sind die Rezeptoren optimal präpariert, so kann der ternäre Impβ/Imp7/H1-

Komplex leicht aufgereinigt werden. Der aufgereinigte Komplex kann so zur Strukturaufklärung möglicherweise kristallisiert werden. Dies sollte in Zukunft angegangen werden.

4.3 Charakterisierung der Rolle von Imp7 im H1-Importweg

Durch den *in vitro* Import Assay konnte die Aktivität der aufgereinigten Importrezeptoren Impβ und Imp7 belegt werden. Die beobachteten Aktivitäten beim Import des ribosomalen Proteins rpL23a erreichten für beide Rezeptoren ihr Maximum bei einer Konzentration von ≤1 µM, signifikanter Import war aber bereits bei einer Konzentration von jeweils 0,5 µM zu beobachten (vgl. 3.3 und Abb. 30). Dies entspricht insgesamt in etwa den Angaben in der Literatur (Jäkel und Görlich, 1998; Jäkel et al., 1999). Hier wird das Erreichen der maximalen Aktivität bei jeweils etwa 0,5 µM angegeben. Das aufgereinigte Heterodimer aus Impβ und Imp7 zeigte beim Import von $H1^0$ und $H1.2^2$ eine hohe Aktivität bereits bei einer Konzentration von 0,5 µM, die maximale Aktivität wurde bei einer Konzentration von 1 µM erreicht (vgl. 3.3 und Abb. 31). Auch dies deckt sich in etwa mit den Angaben in der Literatur (Jäkel et al., 1999; Bäuerle et al., 2002) Da sich beim Import beide Histone bezüglich des Importverhaltens mit dem Impβ/Imp7-Heterodimer in jeder Hinsicht gleich verhielten, werden sie im Folgenden zusammenfassend als H1 bezeichnet. Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, daß sich das Impβ/Imp7-Heterodimer offensichtlich vor der Bindung an H1 gebildet haben muß, um einen vollständigen Import vermitteln zu können. Wird nämlich zunächst nur einer der beiden Importrezeptoren mit dem Histon inkubiert, so ergibt sich ein anderes Bild (vgl. 3.3 und Abb. 31):

Wird Impβ mit dem Histon vorinkubiert, so kann der Import des Substrats langsam rekonstituiert werden. Der Import erreicht jedoch nie die Effizienz, die das vorgebildete Heterodimer zeigt.

Wird hingegen Imp7 mit H1 vorinkubiert, wird der Import des Substrats vollständig verhindert. Stattdessen sind ausgedehnte Aggregate im gesamten Cytoplasma auffällig, um die Kernmembran legt sich ein dichter Schleier aggregierten Substrats. Die genaue Lokalisation des Schleiers, also cytoplasmatisch oder nucleär, ist nicht auszumachen. Es könnte sich hierbei auch um ein Artefakt infolge einer zu hohen Substratkonzentration handeln. Ein Überschuß des Histons würde ebenso zu ausgeprägten Aggregationen führen. Dasselbe Bild wurde aber schon in der Arbeit von Bäuerle (2002) beobachtet, so daß angenommen werden kann, daß es sich hierbei nicht um ein Artefakt, sondern vielmehr um die tatsächliche Verhinderung eines Imports handelt. Besonders in Hinblick auf die postulierte Rolle von Imp7 als Chaperon für H1 während des Imports (Jäkel et al., 1999; Bäuerle et al., 2002) ist dies bemerkenswert.

Es ist bekannt, daß H1 zwei NLS-Domänen besitzt, eine zentrale, globuläre und eine C-terminale, die reich an basischen Aminosäuren ist (Schwamborn et al., 1998). Impβ ist der einzige bekannte Importrezeptor, der an die globuläre Domäne des Histons binden kann. Imp7 gehört neben anderen, wie z. B. auch Imp5, zu den Rezeptoren, die das C-terminale NLS binden können (Bäuerle et al., 2002). Eine alleinige Bindung an das C-terminale NLS reicht selbst nach späterer Zugabe von Impβ, wie der Import Assay mit Vorinkubation von Imp7 und H1 zeigt (vgl. Abb. 31), nicht aus, um cytoplasmatische Aggregationen zu verhindern, da das Histon Interaktionen mit cytoplasmatischen Proteinen oder Nucleinsäuren eingeht (Jäkel et al., 2002). Es gibt drei Möglichkeiten, wie dieses Ergebnis interpretiert werden kann:

Die erste besteht darin, daß nach vorzeitiger Bindung von Imp7 an das Histon dieses nicht mehr an Impβ binden kann. Die globuläre NLS-Domäne, an die Impβ spezifisch bindet, könnte dabei sterisch durch Imp7 teilweise verdeckt sein, so daß diese verfrühte Bindung von Imp7 einen Teil der globulären Bindungsdomäne für Impβ irreversibel unzugänglich macht. Da aber zur vollständigen Abschirmung der basischen Oberfläche des Histons die Bindung von zwei Rezeptoren erforderlich ist (Jäkel et al., 1999; Bäuerle et al., 2002), hätte dies unweigerlich ungewollte Interaktionen mit Bestandteilen des Cytosols zur Folge.

Zweitens wäre es vorstellbar, daß die globuläre Domäne nicht von Imp7, sondern von unspezifischen Interaktionspartnern von H1 im Cytosol nach der Bindung an Imp7 verdeckt würde. Auch hier könnte Impβ nicht mehr binden.

Die dritte Möglichkeit besteht darin, daß Impβ doch binden könnte, weil die globuläre Domäne überhaupt nicht abgeschirmt würde. Da aber das Histon schon mit anderen Bindungspartnern aggregiert wäre, könnte es durch die Bindung von Impβ nicht mehr gelöst werden.

Die erste Möglichkeit ist wohl die wahrscheinlichste, weil die globuläre Domäne tatsächlich nicht nur die Bindungsdomäne für Impβ darstellt, was die dritte Möglichkeit mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließt. Sie ist auch eine Bindungsdomäne für den typischen Interaktionspartner des Histons, nämlich chromosomale DNA (Hayes et al., 1996; Pruss et al., 1996). Da in früheren Arbeiten festgestellt wurde, daß Core-Histone (Baake et al., 2001; Mühlhäusser et al., 2001) und auch Linker-Histone (Bäuerle et al., 2002) neben DNA auch Protein-RNA-Komplexe und tRNA oder mRNA im Cytosol binden können, könnte auch H1 im Cytosol tatsächlich tRNAs, mRNAs oder Protein-RNA-Komplexe binden. Dies würde eine weitere Bindung an Impβ unmöglich machen. Die Bindung des Heterodimers an das Histon ist aber der erste Schritt im Import des Histons. Erst nach der Bindung des Heterodimers kann es zur Translokation von H1 durch den NPC kommen. Nach der Translokation des ternären Komplexes muß dieser dissoziieren, damit H1 seine Funktion als Linker-Histon im Chromatin wahrnehmen kann (vgl. 1.3.5).

Dies wirft die Frage auf, wie und vor allem wo der ternäre Importkomplex aus Impβ, Imp7 und dem Histon nach der Translokation durch den NPC im Karyoplasma dissoziieren kann. Da nämlich die alleinige Bindung von Imp7 an H1 Aggregationen nicht verhindern kann, könnte man daraus folgern, daß der ternäre Komplex bis zur Bindung des Histons an das Chromatin Bestand haben muß. Dies stellt einen aber vor ein weiteres Problem: Da die Translokation durch den Zentralkanal des NPC einem Affinitätsgradienten in Richtung Nucleus folgt (Ben-Efraim und Gerace, 2001), wird am kernwärtigen Ende des Zentralkanals, also am nuclear basket, eine Bindung höchster Affinität zwischen den Importrezeptoren und dem Nucleoporin Nup153 ausgebildet (Ben-Efraim und Gerace, 2001; Bednenko, 2003a). Nup153 ist eindeutig am nuclear basket lokalisiert und geht nur Bindungen mit der Kernlamina ein (Gruenbaum et al., 2000; Daigle et al. 2001). Daher muß vor dem Erreichen des Chromatins der ternäre Komplex von Nup153 dissoziieren. Eine Möglichkeit, diese Bindung zu lösen, bestünde darin, daß der ternäre Komplex ohne RanGTP-Bindung, also energieunabhängig, von Nup153 dissoziiert und auf diese Weise das Chromatin erreicht. Ein vergleichbarer, energieunabhängiger Mechanismus ist für den Impβ/SPN1-Komplex bereits entdeckt worden (Huber et al., 1998).

Die Energie zum Lösen des Impβ/Imp7/H1-Komplexes von Nup153 wird aber vermutlich durch die Bindung von RanGTP an Impβ aufgebracht (Jäkel et al., 1999; Bäuerle et al., 2002), obwohl der Beweis für die Energieabhängigkeit des H1-Imports bislang nicht erbracht worden ist. Solch ein Mechanismus ist aber auch von anderen Importkomplexen, wie dem Impα/Impβ-Komplex bekannt (Adam et al., 1994; Görlich et al., 1994; Moroianu et al., 1995; Imamoto et al., 1995). Dabei könnte eine Konformationsänderung in Impβ ausgelöst werden (Nevo et al., 2003), welche zwangsläufig zur Dissoziation des ternären Komplexes führen würde, da die Bindungsdomänen in Impβ für Imp7 und RanGTP überlappen (Jäkel et al., 1999). Daher müsste der ternäre Komplex vor dem Erreichen des Chromatingerüsts schon zerfallen sein.

Wenn aber Imp7 tatsächlich eine Chaperonaktivität besitzt, wie es berichtet wurde (Jäkel und Görlich, 1998; Jäkel et al. 1999; Bäuerle et al., 2002), dann ist offen, warum es nach der Dissoziation von Impβ diese Funktion ausüben kann, während es dazu offensichtlich nicht in der Lage ist, wenn es alleine, ohne Impβ, an das Histon bindet. Hierfür scheint eine Erklärung besonders plausibel: Die initiale Bindung von Imp7 an Impβ wirkt sich in einer Konformationsänderung von Imp7 aus. Die Bindungsdomäne von Imp7 für Impβ ist bekannt, sie umfaßt die letzten, C-terminalen 31 Aminosäuren von Imp7 (Bäuerle et al., 2002). Von Impβ seinerseits ist bekannt, daß es sehr flexibel Strukturen seiner Bindungspartner binden kann (Cingolani et al., 1999, Vetter et al., 1999; Bayliss et al., 2000; Fukuhara et al., 2004; vgl. Abb. 7)

Im Vergleich dieser Aussage mit der Sekundärstrukturvorhersage von PSIpredict (McGuffin et al., 2000; Jones, 1999, Abb. 35a und b) fällt auf, daß die Bindungsdomäne von Imp7 für Impβ keinerlei Sekundärstrukturelemente enthält. Ihre Flexibilität ist wahrscheinlich die Voraussetzung für eine spezifische Interaktion mit Impβ und vor allem eine darauf folgende spezifische Interaktion mit H1. Denn durch die Interaktion mit Impβ könnten die beiden C-terminalen, sauren Loops (vgl. Abb. 35b) in einer Art und Weise positioniert werden, die es Imp7 erlaubt, in spezifischer Weise an das C-terminale, sehr basische NLS des Histons H1 zu binden. Auf die gleiche Weise könnten die sauren Loops von Imp7 daran gehindert werden, unspezifisch an einen Teil der globulären Domäne zu binden. Dies könnte erklären, warum die Bildung des Heterodimers aus Impβ und Imp7 vor der Bindung von H1 essentiell ist, und warum das Binden von Impβ am Histon vor der Bindung von Imp7 dennoch einen Import ermöglicht. Weiterhin wird diese Hypothese durch die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von Impβ, Imp7 und dem Impβ/Imp7-Heterodimer zu H1-Histonen unterstützt: Die einzelnen Rezeptoren weisen eine deutlich geringere Affinität zum Histon auf als das Heterodimer aus beiden Rezeptoren (Jäkel et al., 1999).

Um mit diesem Modell der Konformationsänderung von Imp7 nach Impβ-Bindung zu erklären, warum Imp7 nach der Dissoziation von Impβ eine Aggregation des Histons im Karyoplasma verhindern kann, muß angenommen werden, daß durch die Konformationsänderung der C-terminalen Bindungsdomäne von Imp7 nach der Bindung von Impβ diese später, also nach der Dissoziation von Impβ, auf eine andere, nämlich sehr viel spezifischere Weise die globuläre Domäne von H1 binden kann. Damit könnte Imp7 H1 nun vor unerwünschten Interaktionen im Karyoplasma abschirmen. Dies wäre vor der Impβ-Bindung im Cytosol nicht möglich gewesen. Dafür spricht, daß eine große Flexibilität von Importrezeptoren vor und nach Substratbindung bereits durch Small-Angle-X-Ray-Scattering(SAXS)-Experimente beobachtet werden konnte (Fukuhara et al., 2004).
Abb. 36 zeigt die enorme Flexibilität von Impβ und Transportin, einem weiteren Rezeptor der Impβ-Familie (Pollard et al., 1996). Es sind nicht nur die ungebundenen Rezeptoren dargestellt, sondern auch ihre Konformationen nach der Substratbindung. Hierbei ändert sich nicht nur die relative Position der α-Helices zueinander. Im Falle von Impβ kann sich auch die relative Position von Aminosäuren zueinander innerhalb eines Loops (vgl. Abb. 7) verändern, je nachdem welches Substrat gebunden ist. Da die beiden C-terminalen Loops von Imp7 wesentlich ausgedehnter zu sein scheinen als jene von Impβ, liegt die Schlußfolgerung nahe, daß hier eine ähnlich große, wenn nicht sogar größere Flexibilität gegeben ist. Die Wahrscheinlichkeit für einen sog. „conformational switch“ ist damit relativ hoch.

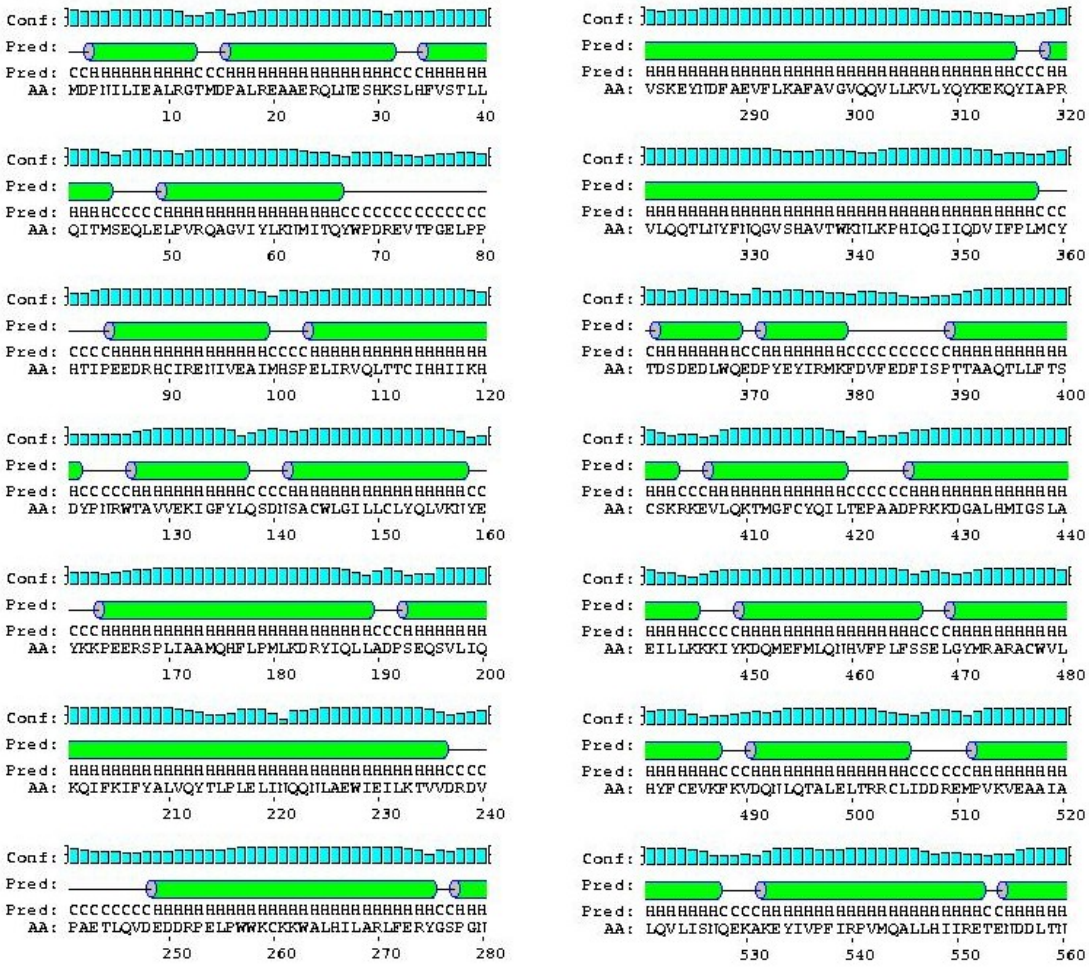


Abb. 35a: Sekundärstrukturvorhersage für die Aminosäuren 1-560 von Imp7 aus *Xenopus laevis*. Die Vorhersage durch PSIpredict zeigt deutlich das massierte Auftreten von α-Helices (grüne Balken) in der Sekundärstruktur. Sie bilden die für ein Impβ-Familien-Protein charakteristische, periodische Abfolge von HEAT-repeats. Die Höhe der türkis gefärbten Sockel über den einzelnen Aminosäuren gibt die Konfidenz der Vorhersage wider. C = Loop; H = Helix.

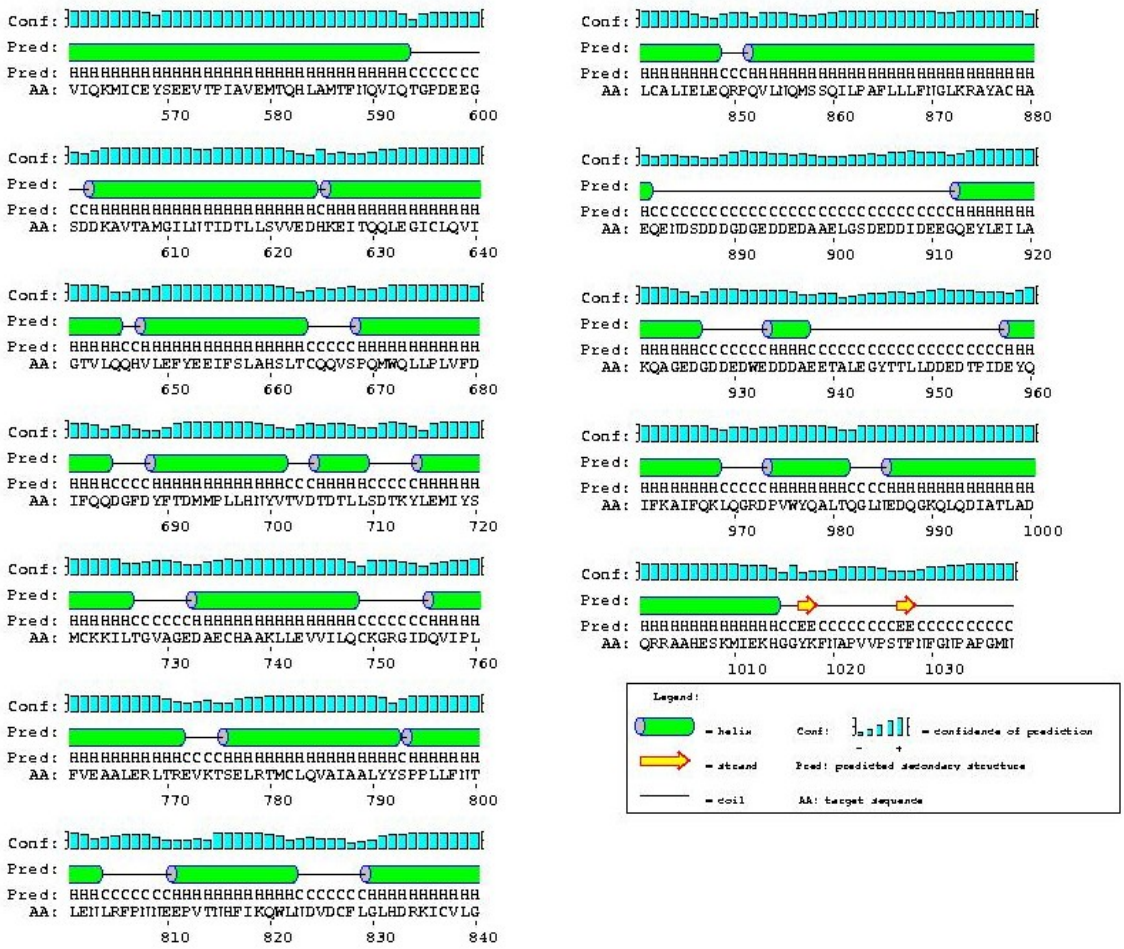


Abb. 35b: Sekundärstrukturvorhersage für die Aminosäuren 561-1038 von Imp7 aus *Xenopus laevis.* Am C-Terminus von Imp7 fällt besonders das Auftreten zweier langer Loops von aa 882-912 und von aa 927-957 auf. Sie sind jeweils besonders reich an sauren Aminosäureresten. Die Bindungsdomäne für Impβ, also etwa die letzten 30 Aminosäuren, zeigt keine besonderen Sekundärstrukturelemente. Die vorhergesagten Faltblätter können aufgrund ihrer Kürze vernachlässigt werden. Grüne Balken sind Helices, gelbrote Pfeile sind Faltblätter, die Höhe der türkisfarbenen Sockel stellt die Konfidenz der Vorhersage dar. H = α-Helix; E = β-Faltblatt; C = Loop.

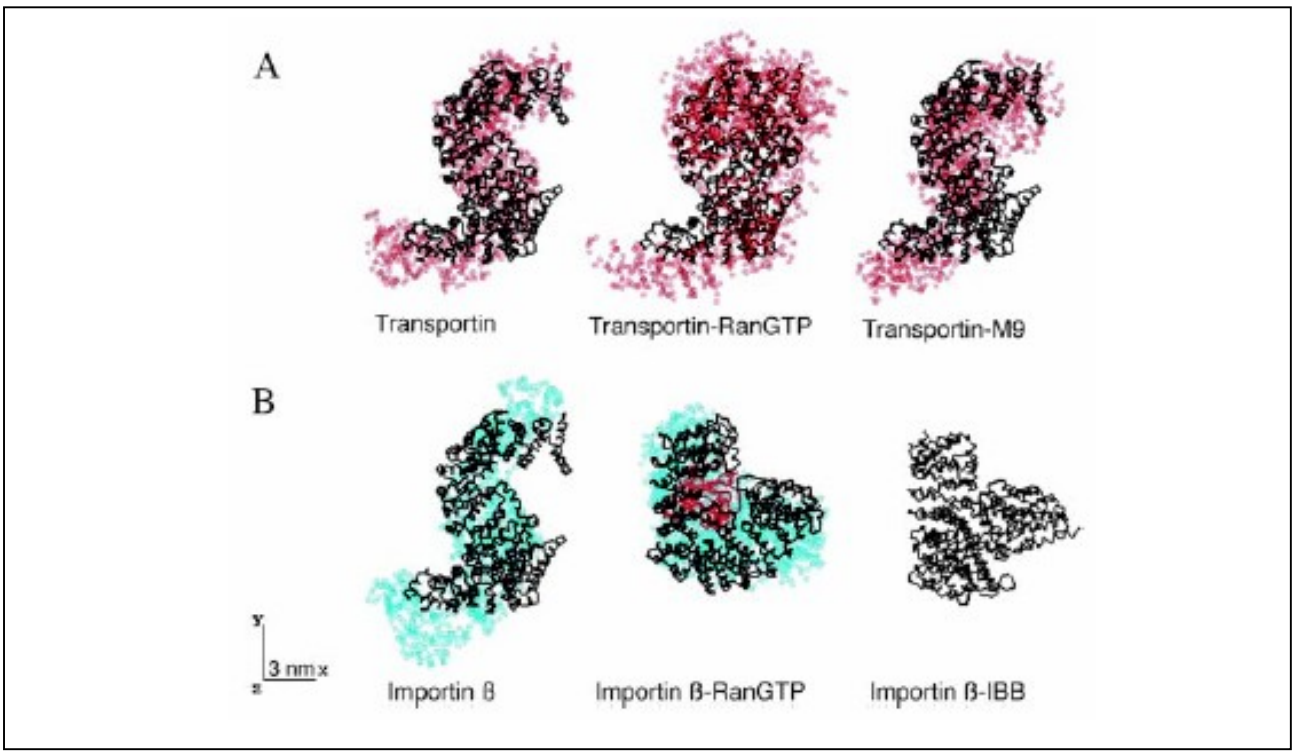


Abb. 36: Molekulare Umrisse von Importinen in ungebundenem, Ran-GTP-gebundenem und substratgebundenem Zustand.

(A) Transportin. SAXS-*ab-initio*-Rekonstruktionen von ungebundenem Transportin (links), Ran-GTP-gebundenem Transportin (Mitte) und M9-gebundenem Transportin (rechts) sind in rot dargestellt und zeigen alle eine ähnliche Gestalt. In der Mitte ist in schwarz die Kristallstruktur von Ran-GTP-Transportin darüber gelegt, links und rechts jeweils die Kristallstruktur von ungebundenem Transportin.
(B) Importin β. SAXS-*ab-initio*-Modelle von ungebundenem (links) und Ran-GTP-gebundenem (Mitte) Impβ sind in grün dargestellt und zeigen, daß Impβ große Konformationsänderungen während der Bindung von Ran-GTP erfährt. Die korrespondierenden Kristallstrukturen sind jeweils in schwarz darüber gelegt. Rechts ist die Kristallstruktur von Impβ-IBB_{α} (IBB_{α} = Importin-β-bindende Domäne von Impα) als Referenz abgebildet.
(Abb. entnommen aus Fukuhara et al., J. Biol. Chem. 2004)

Es kann abschließend folgende Hypothese formuliert werden:

Es müssen vier verschiedene Konformationen von Imp7 während des Imports des Linker-Histons H1 existieren:

Die erste stellt den ungebundenen Rezeptor dar. Die C-terminalen, sauren Loops sind frei beweglich. Sie können eine spezifische Bindung mit dem C-terminalen NLS des Histons eingehen, würden dabei aber durch unspezifische Interaktionen mit der globulären Domäne des Histons die Bindung von Impβ so weit behindern, daß eine Aggregation von H1 an Protein-RNA-Komplexen kinetisch bevorzugt wäre.

Die zweite Konformation wird im Komplex mit Impβ eingenommen. Der C-Terminus ist durch die direkte Bindung an Impβ fixiert und die sauren Loops für eine spezifische Bindung des C-terminalen NLS von H1 positioniert. Sie können nicht mit der globulären Domäne interagieren und damit nicht um diese mit Impβ konkurrieren.

Die dritte Konformation tritt im ternären Impβ/Imp7/H1-Komplex auf. Beide Importrezeptoren umhüllen das Substrat, so daß es nicht mit anderen möglichen Bindungspartnern interagieren kann. In dieser Konformation durchtritt der Komplex den NPC und bindet schließlich an Nup153 am Ende der Kernpore.
Durch die Bindung von RanGTP an Impβ dissoziiert das Imp7/H1-Heterodimer vermutlich von Impβ. Ob die RanGTP-Bindung allerdings tatsächlich direkt für das Ablösen von Nup153 verantwortlich ist, oder ob diese Dissoziation zu einem späteren Zeitpunkt geschieht, muß erst noch untersucht werden.
In seiner vierten Konformation ist Imp7 durch die vorangegangene Positionierung seiner sauren Loops durch Impβ nun in der Lage, die basische Oberfläche des Histons vollständig abzuschirmen und als Chaperon zu fungieren.
Schließlich löst sich das Histon und bindet aufgrund seiner höheren Affinität zu DNA als zu Imp7 an ein Nucleosom im Chromatin. Die Bindung von RanGTP an Imp7 erniedrigt dabei die Affinität von Imp7 zum Histon und beschleunigt damit die Dissoziation. Zusätzlich gewährleistet die Bindung von RanGTP den Reexport des Rezeptors.

Daß mehrere Konformationen von Imp7 und Impβ während des H1-Imports auftreten, kann aufgrund der zuvor angeführten Argumente als sicher angesehen werden.
Um die formulierte Hypothese für den Mechanismus der Substratbindung und -frei-setzung überprüfen zu können, müssen die möglichen Zwischenprodukte des Imports zunächst biochemisch charakterisiert werden. Die Bindung von H1-Histonen an cytosolische Bestandteile, wie z. B. tRNAs, mRNAs und RNA-Proteinkomplexen nach der Bindung an entweder Impβ oder Imp7 könnte *in vitro* überprüft werden, z. B. über einen Pulldown Assay. Auf die gleiche Weise ließe sich das Bindungsverhalten des Impβ/H1-Komplexes oder des Imp7/H1-Komplexes in Gegenwart des jeweils anderen Importrezeptors untersuchen. Beide Ansätze gemeinsam könnten die Bildung von Aggregaten im Cytosol erklären. Die postulierte Energieabhängigkeit des NPC-Durchtritts des ternären Komplexes, also die Dissoziation von Nup153 nach RanGTP-Bindung ließe sich in Gegenwart eines nicht hydrolysierbaren GTP-Analogons, wie zum Beispiel PNP-GMP, nachweisen. Dies könnte im *in vitro* Import Assay gezeigt werden, wenn durch einen Rezeptorüberschuss ein möglicher „single-round"-Import sichtbar gemacht würde. Dies könnte alternativ durch eine Antikörperfärbung gegen die Fluoreszenzsequenz des im Import Assay verwendeten Histons erreicht werden. Darüberhinaus sind weitere biochemische Charakterisierungen nötig. Hierbei sollte insbesondere mithilfe von Deletionsmutanten auf die sauren Loops im C-Terminus von Imp7 und ihre Interaktionen mit Impβ und H1 eingegangen

werden. Weiterhin muß geklärt werden, von welcher Gestalt die verschiedenen Konformationen von Imp7 und Impβ während des H1-Imports sind.
Für die Aufklärung der Strukturen dieser Konformationen wird es notwendig sein, die einzelnen Zwischenprodukte des Importprozesses zu kristallisieren, um eine Röntgenstrukturanalyse zu ermöglichen. So könnte geklärt werden, ob eine Änderung der Konformation dieser Loops in Abhängigkeit von Impβ für die Chaperonaktivität von Imp7 verantwortlich ist.

4.4 Kristallisation von Importin 7

Es konnten keine Kristalle von Imp7 produziert werden, die groß genug für ein Röntgenbeugungsexperiment gewesen wären. Erste Kristallisationsbedingungen konnten aber gefunden werden. Die Kristalle ließen sich bislang nicht verläßlich reproduzieren, zeigen aber alle eine ähnliche äußere Gestalt. Sie sind dreidimensional, nicht nadelförmig und scheinen mindestens acht Flächen zu haben. Sie sind allerdings zu klein, als daß ihre Gestalt exakt bestimmt werden könnte. Daß es sich hierbei um Artefakte aufgrund gleicher oder ähnlicher Salze in den Kristallisationsbedingungen handeln könnte, kann ausgeschlossen werden, da diese Kristalle in Gegenwart völlig unterschiedlicher Salze gewachsen sind. Es scheint generell günstig zu sein, wenn der pH-Wert im Tropfen zwischen 5 und 6 liegt, da dies auf zwei der vier Bedingungen, in denen die ersten Kristalle gewachsen waren, zutrifft, nämlich CS1/47 und CS2/2. Dies entspricht in etwa der Regel, daß viele Proteine bei einem pH-Wert kristallisieren, der etwa um eins über oder unter dem isoelektrischen Punkt des Proteins liegt (R. Ficner, persönliche Mitteilung). Der theoretische pI von Imp7 wurde auf 4,6 berechnet. Die Bedingung CS2/2 mit CTAB, $MgCl_2$ und NaCl scheint ein guter Ansatzpunkt für weitere Kristallisationstests zu sein, da unter Zusatz von Additiven und dem Detergens Triton X-100 in insgesamt drei weiteren Bedingungen Nucleationskeime entstanden. Die gebildeten Kristalle waren stets von der gleichen Form, wie jene, welche sich auch in den anderen Bedingungen gebildet hatten. Da die einzige Gemeinsamkeit aller Bedingungen der Zusatz von Imp7 ist, sind die gebildeten Kristalle höchstwahrscheinlich Proteinkristalle. Dafür spricht auch, daß in den Screens um CS2/2 ausschließlich klares, amorphes Protein zu beobachten war. Dies ist ein Anzeichen dafür, daß die Bedingung zur Kristallformation geeignet sein kann (M. Rudolph und O. Einsle, 2004, persönliche Mitteilung).

Die Co-Kristallisation von Imp7 mit Impβ gelang nicht, es war auch bislang keinerlei Kristallbildung zu beobachten. Allerdings wurden vor dem Pipettieren der Co-

Kristallisationsansätze beide Importrezeptoren nicht gemeinsam aufgereinigt, sondern lediglich vor dem Pipettieren äquimolar gemeinsam inkubiert (vgl. 3.4.2).
So konnte nicht sichergestellt werden, daß das Impβ/Imp7-Heterodimer in ausreichender Konzentration vorlag, um die Kristallisationstropfen in den Zustand der Übersättigung zu überführen. Nur dann aber kann es zur Bildung von Nucleationskeimen kommen. Die Co-Affinitätsaufreinigung sollte die richtige Methode sein, um dieses Problem zu beseitigen.

Da Imp7 offensichtlich eine sehr hohe Flexibilität aufweist (Fukuhara et al., 2004), eine zu hohe, um leicht kristallisiert werden zu können, sollten neben Impβ in Zukunft noch weitere Substrate von Imp7 für eine Co-Kristallisation herangezogen werden. Dadurch könnte das Protein in seiner Konformation stabilisiert werden. Denkbare Kristallisationspartner wären neben dem Linker-Histon H1 auch bekannte Bindungspartner, wie das ribosomale Protein rpL23a (Jäkel und Görlich, 1998) und die Integrase aus dem Präintegrasekomplex von HIV-1 (Fassati und Goff, 2001; Fassati et al., 2003). Daneben sollten auch Deletionsmutanten von Imp7 für Kristallisationstests verwendet werden. Dies könnte das Problem der Flexibilität einzelner Domänen zueinander beseitigen. Dabei sollten solche Deletionsmutanten benutzt werden, deren Deletionen sich an den Schnittstellen orientieren, die aus den Sekundärstrukturvorhersagen als unproblematisch für den Erhalt der funktionellen Domänen eingestuft werden können. Hierfür sollten vor allem Schnittstellen in Schleifen (engl. „loops“) in Betracht kommen, welche für den Erhalt der Affinität zum jeweiligen Substrat nicht essentiell sind. Die Sekundärstrukturvorhersage von PSIpredict gibt einige Anhaltspunkte für solche Deletionsschnittstellen (Abb.35a und b). Die Vorhersagen anderer Programme, wie zum Beispiel nnpredict oder PROF, sind sehr ähnlich (nicht dargestellt). Die Deletionsmutanten sollten zunächst durch eine biochemische Charakterisierung der Funktionalität in Bezug auf ihre jeweiligen Interaktionspartner verifiziert werden. Hierbei sollte besonders der Erhalt der Affinität zum Substrat und die Bindungskonstante des Rezeptor-Substrat-Komplexes sowie die Funktionalität im Mittelpunkt stehen. Die Kalorimetrie kann herangezogen werden, um die Bindungskonstanten und damit die Affinitäten der Deletionsmutanten zum Substrat zu bestimmen, der *in vitro* Import Assay könnte die Funktionalität der Mutanten im Substratimport verifizieren.

5. Zusammenfassung

Der Kernimportrezeptor Importin 7 ist eine wichtige Komponente der Kerntransportmaschinerie vieler höherer Eukaryoten. Neben seiner Rolle als Rezeptor für den Import ribosomaler Proteine erfüllt Imp7 die Rolle eines Corezeptors neben Impβ beim Import von Substraten mit ausgedehnten basischen Oberflächenbereichen. Er unterscheidet sich damit von klassischen Adaptern wie z. B. Importin α.

Eine besondere Funktion von Imp7 ist die eines Chaperons beim Import basischer, karyophiler Substrate.

In dieser Arbeit wurde die Untersuchung der besonderen Eigenschaften von Imp7 von mehreren Seiten aus angegangen: Einerseits wurde Imp7 für röntgenkristallographische Untersuchungen in hochreiner Form gewonnen, und es konnten erste Kristallisationsbedingungen gefunden werden, die solche Untersuchungen in der Zukunft erlauben könnten. Zusätzlich gelang die Co-Aufreinigung von Imp7 mit Impβ. Dies ermöglicht weitere Kristallisationstests. Darüberhinaus konnte ein Ansatz erarbeitet werden, wie sich der ternäre Komplex aus Imp7, Impβ und dem Linker-Histon H1 für eine Kristallisation aufreinigen läßt.

Andererseits konnte das Verhalten von Imp7 und Impβ beim Import des Linker-Histons H1 durch den *in vitro* Import Assay näher beleuchtet werden. Bei diesem Importweg nimmt Imp7 zusätzlich die Aufgabe eines Chaperons war. Es wurde eine Hypothese entwickelt, wie Imp7 diese Rolle beim abschließenden Transport des Histons von der Kernpore zur chromosomalen DNA erfüllen könnte: Durch die initiale Bindung von Impβ vor der Substratbindung im Cytosol wird in Imp7 ein „conformational switch“ umgelegt, wodurch unspezifische Interaktionen der C-terminalen Bindungsdomäne von Imp7 für H1 mit dem Histon verhindert werden. Dabei wird die Voraussetzung geschaffen, daß nach der Dissoziation von Impβ am nuclear basket oder im Karyoplasma diese Domäne von Imp7 nun in spezifischer Weise die basischen Regionen auf der Oberfläche von H1 vor Interaktionen mit Bestandteilen des Karyoplasmas schützen kann. Nach dieser Hypothese wäre die Chaperonaktivität von Imp7 beim Import von H1 also Impβ-abhängig.

5. Summary

The nuclear import receptor importin 7 is a major component of the nuclear import machinery of many of the higher eukaryotes. Besides its role as a receptor for the nuclear import of ribosomal proteins imp7 fulfils an additional function as a co-receptor with impβ during import of substrates with extended, basic surfaces. Thus imp7 differs from classical adapters such as Impα.

A special function of imp7 is its chaperoning activity during the import of basic, karyophilic substrates.

In this thesis the analysis of the special features of imp7 was tackled in several approaches:

On the one hand imp7 was highly purified in order to allow crystallographic studies and first conditions could be spotted which might render such investigations possible in the future. Additionally the co-purification of imp7 with impβ succeeded, thus potentiating further crystallization tests. Furthermore an assay could be developed in which the ternary complex of impβ, imp7 and the linker histone H1 can easily be purified for crystallization.

On the other hand the behaviour of impβ and imp7 during import of the linker histone H1 could be elucidated more precisely. In this import pathway imp7 shows a supplementary chaperoning activity. A hypothesis was developed, which might explain how imp7 could fulfil its dual function as an import receptor and as a chaperone during the final steps of histone transport from the nuclear pore to chromosomal DNA: The initial binding of impβ to imp7 before binding the substrate in the cytosol activates a conformational switch in imp7, thus preventing unspecific interactions of the C-terminal H1-binding domain of imp7 with the histone. Thereby the foundations are laid for specific binding of this domain of imp7 to the basic regions on the surface of the histone after dissociation of impβ either at the nuclear basket or in the karyoplasm. In this way the basic surface of the histone could be protected from unspecific interactions with karyoplasmic components. According to this hypothesis the chaperoning activity of imp7 is impβ-dependent.

6. Literaturverzeichnis

Adam, E. J. H., Adam S. A., 1994: Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. J. Cell Biol. 125: 547-555.

Adam, S. A., Sterne Marr, R., Gerace, L., 1990: Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. J. Cell Biol. 111: 807-816.

Adam, S. A., Gerace, L., 1991: Cytosolic proteins that specifically bind nuclear localization signals are receptors for nuclear import. Cell 66: 837-847.

Allen, T. D., Cronshaw, J. M., Bagley, S., Kiseleva, E., Goldberg, M. W., 2000: The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. J. Cell Sci. 113: 1651-1659.

Baake, M., Bäuerle, M., Doenecke, D., Albig, W., 2001: Core histones and linker histones are imported into the nucleus by different pathways. Eur. J. Cell Biol. 80 (11): 669-677.

Baker, S. E., Lorenzen, J. A., Miller, S. W., Bunch, T. A., Jannuzi, A. L., Ginsberg, M. H., Perkins, L. A., Brower, D. L., 2002: Genetic interaction between integrins and moleskin, a gene encoding a Drosophila homolog of importin-7. Genetics 162 (1): 285-296.

Bäuerle, M., Doenecke, D., Albig, W., 2002: The requirement of H1 histones for a heterodimeric nuclear import receptor. J. Biol. Chem. 277 (36): 32480-32489.

Bayliss, R., Corbett, A. H., Stewart, M., 2000a: The molecular mechanism of transport of macromolecules through nuclear pore complexes. Traffic 1: 448-456.

Bayliss, R., Littlewood, T., Stewart, M., 2000b: Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. Cell 102 (1): 99-108.

Bayliss, R., Littlewood, T., Strawn, L. A., Wente, S. R., Stewart, M., 2002: GLFG and FxFG nucleoporins bind to overlapping sites on importin-beta. J Biol. Chem. 277 (52): 50597-50606.

Bednenko, J., Cingolani, G., Gerace, L., 2003a: Nucleocytoplasmic transport: navigating the channel. Traffic 4: 127-135.

Bednenko, J., Cingolani, G., Gerace, L., 2003b: Importin β contains a COOH-terminal nucleoporin binding region important for nuclear transport. J. Cell Biol. 162 (3): 391-401.

Ben-Efraim, I., Gerace, L., 2001: Gradient of increasing affinity of importin β for nucleoporins along the pathway of nuclear import. J. Cell Biol. 152 (2): 411-417.

Bischoff, F. R., Ponstingl, H., 1991: Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. Nature 354: 80-82.

Bischoff, F. R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A., Ponstingl, H., 1994: RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear ras-related Ran. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2587-2591.

Bischoff, F. R., Postingl, H., 1995: Catalysis of guanine nucleotide exchange of Ran by RCC1 and stimulation of hydrolysis of Ran-bound GTP by Ran-GAP1. Methods Enzymol. 257: 135-144.

Bischoff, F.R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., Ponstingl, H., 1995: Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. EMBO J. 14 (4): 705-715.

Bischoff, F. R., Görlich, D., 1997: RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin β-related nuclear transport factors. FEBS Lett. 419: 249-254.

Breeuwer, M., Goldfarb, D. S., 1990: Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. Cell 60 (6): 999-1008.

Chaillan-Huntington, C., Braslavsky, C. V., Kuhlmann, J., Stewart, M., 2000: Dissecting the interactions between NTF2, RanGDP and the nucleoporin *X*F*X*FG repeats. J. Biol. Chem. 275 (8): 5874-5879.

Chi, N. C., Adam, E. A., Adam, S. a., 1995: Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear import factor P97. J. Cell Biol. 130: 265-274.

Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K., Müller, C. W., 1999: Structure of importin-beta bound to the IBB-domain of importin-alpha. Nature 399: 221-229.

Cordes, V. C., Reidenbach, S., Franke, W. W., 1995: High content of a nuclear pore complex protein in cytoplasmic annulate lamellae of Xenopus oocytes. Eur. J. Cell Biol. 68 (3):240-255.

Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T., Matunis, M. J., 2002: Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. J. Cell Biol. 158: 915-927.

Daigle, N., Beaudouin, J., Hartnell, L., Imreh, G., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J., Ellenberg, J., 2001: Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. J. Cell Biol. 154 (1): 71-84.

Davis, L. I., 1992: Control of nucleocytoplasmic transport. Curr. Opin. Cell Biol. 4 (3): 424-429.

Doye, V., Hurt, E., 1997: From nucleoporins to nuclear pore complexes. Curr. Opin. Cell Biol. 9: 401-411.

Farnet, C. M., Haseltine, W. A., 1991: Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. J. Virol. 65: 1910-1915.

Fassati, A., Goff, S. P., 2001: Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. 75: 3626-3635.

Fassati, A., Görlich, D., Harrison, I., Zaytseva, L., Mingot, J.-M., 2003: Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7. EMBO J. 22 (14): 3675-3685.

Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., Mattaj, I. W., 1997: CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. Cell 90 (6): 1051-1060.

Fukuda, M., Gotoh, I., Adachi, M., Gotoh, Y., Nishida, E., 1997: A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. J. Biol. Chem. 272 (5): 32642-32648.

Fukuhara, N., Fernandez, E., Ebert, J., Conti, E., Svergun, D., 2004: Conformational variability of nucleo-cytoplasmic transport factors. J. Biol. Chem. 279 (3): 2176-2181.

Geyer, M., Assheuer, R., Klebe, C., Kuhlmann, J., Becker, J., Wittinghofer, A., Kalbitzer, H. R., 1999: Conformational states of the nuclear GTP-binding protein Ran and its complexes with the exchange factor RCC1 and the effector protein RanBP1. Biochemistry 38 (35): 11250-11260.

Goff, S. P., 2001: Intracellular trafficking of retroviral genomes during the early phase of infection: viral exploitation of cellular pathways. J. Gene Med. 3: 517-528.

Görlich, D., Prehn, S., Laskey, R. A., Hartmann, E., 1994: Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. Cell 79: 767-778.

Görlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dinwall, C., Laskey, R. A., Hartmann, E., Prehn, S., 1995a: Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. Curr. Biol. 5: 383-392.

Görlich, D., Vogel, F., Mills, A. D., Hartmann, E., Laskey, R. A., 1995b: Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. Nature 377: 246-248.

Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A., Hartmann, E., 1996a: A 41 amino acid motif in importin α confers binding to importin β and hence transit into the nucleus. EMBO J. 15: 1810-1817.

Görlich, D., Panté, N., Kutay, U., Aebi, U., Bischoff, F. R., 1996b: Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. EMBO J. 15: 5584-5594.

Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F. R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S., Izaurralde, E., 1997a: A novel class of RanGTP binding proteins. J. Cell Biol. 138: 65-80.

Görlich, D., 1997b: Nuclear protein import. Curr. Opin. Cell Biol. 9: 412-419.

Görlich, D., 1998: Transport into and out of the cell nucleus. EMBO J 17 (10): 2721-2127.

Görlich, D., Kutay, U., 1999: Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 15: 607-660.

Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., Saxon, A., 1981: *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N. Engl. J. Med. 305: 1425-1431.

Gruenbaum, Y., Wilson, K. L., Harel, A., Goldberg, M., Cohen, M., 2000: Review: nuclear lamins--structural proteins with fundamental functions. J. Struct. Biol. 129 (2-3): 313-323.

Guiochon-Mantel, A., Delabre, K., Lescop, P., Milgrom, E., 1994: Nuclear localization signals also mediate the outward movement of proteins from the nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 7179-7183.

Hayes, J. J., Kaplan, R., Ura, K., Pruss, D., Wolffe, A., 1996: A putative DNA binding surface in the globular domain of a linker histone is not essential for specific binding to the nucleosome. J. Biol. Chem. 271 (42): 25817-25822.

Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M., Lührmann,R., 1998: Snurportin1, an m_3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. EMBO J. 17 (14): 4114-4126.

Imamoto, N., Shimamoto, T., Kose, S., Takao, T., Tachibana, T., Matsubae, M., Sekimoto, T., Shimonishi, Y., Yoneda, Y., 1995: The nuclear pore-targeting complex binds to nuclear pores after association with a karyophile. FEBS Lett. 368: 415-419.

Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I. W., Görlich, D., 1997: The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. EMBO J. 16: 6535-6547.

Jäkel, S., Görlich, D., 1998: Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. EMBO J. 17: 4491-4502.

Jäkel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F. R., Schwamborn, K., Doenecke, D., Görlich, D., 1999: The importin β/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. EMBO J 18 (9): 2411-2423.

Jäkel, S., Mingot, J. M., Schwarzmaier, P., Hartmann, E., Görlich, D., 2002: Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. EMBO J. 21 (3): 377-386.

Jones, D. T., 1999: Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. J. Mol. Biol. 292: 195-202.

Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F., Smith, A. E., 1984: Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. Nature 311: 33-38.

Klebe, C, Bischoff, F. R., Postingl, H., Wittinghofer, A., 1995: Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1. Biochem 34 (2): 639-647.

Lanford, R. E., Butel, J. S., 1984: Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. Cell 37: 801-813.

Lanford, R.E., Kanda, P., Kennedy, R. C., 1986: Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. Cell 46: 575-582.

Lorenzen, J. A., Baker, S. E., Denhez, F., Melnick, M. B., Brower, D. L., Perkins, L. A., 2001: Nuclear import of activated D-ERK by DIM-7, an importin family member encoded by the gene moleskin. Development 128 (8): 1403-1414.

Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., Melchior, F., 1997: A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. Cell 88 (1): 97-107.

Mahajan, R., Gerace, L., Melchior, F., 1998: Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. J. Cell Biol. 140: 259-270.

Mattaj, I.W., Englmeier, L., 1998: Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. Annu. Rev. Biochem. 67: 265-306.

McGuffin, L. J., Bryson, K., Jones, D.T., 2000: The PSIPRED protein structure prediction server. Bioinformatics. 16: 404-405.

Melchior, F., Paschal, B. M., Evans, J., Gerace, L., 1993: Inhibition of nuclear protein import by non-hydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. J. Cell Biol. 123: 1649-1659.

Melese, T., Xue, Z., 1995: The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. Curr. Opin. Cell Biol. 7:319-324.

Moore, M. S., Blobel, G., 1993: The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. Nature 365: 661-663.

Moore, M. S., Blobel, G., 1994: Purification of a Ran-interacting protein that is required for protein import into the nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10212-10216.

Moroianu, J., Blobel, G., Radu, A., 1995: Previously identified protein of uncertain function is karyopherin α and together with karyopherin β docks import substrate at nuclear pore complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA92: 2008-2011.

Mühlhäusser, P., Müller, E.-C., Otto, A., Kutay, U., 2001: Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. EMBO Rep. 21 (81): 690-696.

Nakielny, S., Dreyfuss, G., 1997: Nuclear export of proteins and RNAs. Curr. Opin. Cell Biol. 9: 420-429.

Nakielny, S., Dreyfuss, G., 1999a: Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. Cell 99: 677-690.

Nakielny, S., Shaikh, S., Burke, B., Dreyfuss, G., 1999b: Nup153 is an M9-containing mobile nucleoporin with a novel Ran-binding domain. EMBO J. 18 (7): 1982-95.

Nevo, R., Stroh, C., Kienberger, F., Kaftan, D., Brumfeld, V., Elbaum, M., Reich, Z., Hinterdorfer, P., 2003: A molecular switch between alternative conformational states in the complex of Ran and importin beta1. Nat. Struct. Biol. 10 (7): 553-557.

Nicolás, F. J., Moore, W., Zhang, C., Clarke, P. R., 2001: XMog1, a nuclear Ran-binding protein in *Xenopus*, is a functional homologue of *Schizosaccharomyces pombe* Mog1p that co-operates with RanBP1 to control generation of Ran-GTP. J. Cell Sci. 114: 3013-3023.

Nigg, E. A., Bauerle, P. A., Lührmann, R., 1991: Nuclear import-export: in search of signals and mechanisms. Cell 66 (1): 15-22.

Oki, M., Nishimoto, T., 1998: A protein required for nuclear-protein import, Mog1p, directly interacts with GTP-Gsp1p, the *Saccharomyces cerevisiae* Ran homologue. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 15388-15393.

Ossareh-Nazari, B., Bachelerie, F., Dargemont, C., 1997: Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. Science 278 (5335): 141-144.

Paine, P. L., Moore, L. C., Horowitz, S. B., 1975: Nuclear envelope permeability. Nature 254:109-114.

Pante, N., Aebi, U., 1996: Molecular dissection of the nuclear pore complex. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 31 (2):153-199.

Paschal, B. M., Gerace, L., 1995: Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore complex protein p62. J. Cell Biol. 129: 1649-1659.

Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielny, S., Siomi, M. C., Wang, F., Dreyfuss, G., 1996: A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. Cell 86: 985-994.

Pruss, D., Bartholomew, B., Persinger, J., Hayes, J., Arents, G., Moudrianakis, E.N., Wolffe, A.P., 1996: An asymmetric model for the nucleosome: a binding site for linker histones inside the DNA gyres. Science 274: 614-617.

Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E. L. Jr., Jarnik, M., Engel, A., Aebi, U., 1990: Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. J. Cell Biol. 110: 883-894.

Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M., Görlich, D., 1998: NTF2 mediates nuclear import of Ran. EMBO J. 17(22): 6587-98.

Ribbeck, K., Görlich, D., 2001: Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. EMBO J. 20 (6): 1320-1330.

Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., Dingwall, C., 1991: Two independent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. Cell 64: 615-623.

Rout, M. P., Blobel, G., 1993: Isolation of the yeast nuclear pore complex. J. Cell Biol. 123: 771-783.

Rout, M. P., Blobel, G., Aitchinson, J. D., 1997: A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. Cell 89: 715-725.

Rout, M. P., Aitchinson, J. D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., Chait, B. T., 2000 : The yeast nuclear pore complex : Composition, architecture and transport mechanism. J. Cell Biol. 148: 635-651.

Schwamborn, K., Albig, W., Doenecke, D., 1998: The histone H1(0) contains multiple sequence elements for nuclear targeting. Exp. Cell Res. 244 (1): 206-217.

Shah, S., Forbes, D. J., 1998 a: Separate nuclear import pathways converge on the nucleoporin Nup153 and can be dissected with dominant-negative inhibitors. Curr. Biol. 8 (25):1376-86.

Shah, S., Tugendreich, S., Forbes, D.. 1998 b: Major binding sites for the nuclear import receptor are the internal nucleoporin Nup153 and the adjacent nuclear filament protein Tpr. J. Cell Biol. 141 (1): 31-49.

Söderqvist, H., Imreh, G., Kihlmark, M., Linnman, C., Ringertz, N., Hallberg, E., 1997: Intracellular distribution of an integral nuclear pore membrane protein fused to green fluorescent protein - localization of a targeting domain. Eur. J. Biochem. 250 (3): 808-813.

Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., Weis, K., 1997: Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. Cell 90 (6): 1041-1050.

Stewart, M., Baker, R. P., 2000: 1.9 Å resolution crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* Ran-binding protein Mog1p. J. Mol. Biol. 299: 213-223.

Stoffler, D., Fahrenkrog, B., Aebi, U., 1999: The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. Curr. Opin. Cell Biol. 11: 391-401.

Ström, A.-C., Weis, K., 2001: Importin-β-like nuclear transport receptors. Genome Biol. 2 (6): 3008.1-3008.9.

Trotman, L. C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R. P., Greber, U. F., 2001: Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. Nature Cell Biol. 3: 1092-1100.

Vetter, I. R., Arndt, A., Kutay, U., Görlich, D., Wittinghofer, A., 1999: Structural view of the Ran-importin-beta interaction at 2.3 Å resolution. Cell 97: 635-646.

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
A	Ampere
Å	Ångstrøm
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
β	beta
BSA	Rinderserumalbumin
c	centi (als Präfix)
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
d	desoxy
D	Dalton
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetracetat
et al.	et altera (lat. und andere)
EtOH	Ethanol
E.coli	Escherichia coli
FG	Phenylalanin/Arginin-reich
γ	gamma
G	Guanosin
g	Gramm
GTP	Guanosin-5´-triphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
hn	heterogen nukleär
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
k	kilo (als Präfix)
kD	Kilodalton
l	Liter
M	molar
m	milli (als Präfix)
µ	mikro (als Präfix)
min	Minute
mRNA	messenger RNA
n	nano (als Präfix)
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localisation signal
Nup	Nukleoporin
OD	Optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
P_i	Orthophosphat
PAGE	Polyacryamidgel-elektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
prä-mRNA	Vorläufer-mRNA
RNA	Ribonucleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
SDS	Natrium-Dodecylsulphat
sn	small nuclear
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N',N'Tetra-methylethylendiamin
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
U snRNP	uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein particle
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
z. B.	zum Beispiel